

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Maarja Grünbach

**Multikomponentsete monooksügenaaside mitmekesisus Läänemere
tolueenilagundajates bakterites**

Magistritöö

Juhendajad: Eeva Heinaru, MSc

Eve Vedler, PhD

Kaitsmisele lubatud

Juhendajate

allkirjad, kuupäev

SISUKORD

LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	6
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1. Läänemere ökosüsteemi ohustavad aromaatsed süsivesinikud ja nende potentsiaalsed degradeerijad	7
2. Aromaatsete ühendite aeroobsed kataboolsed rajad bakterites	8
2.1. Fenooli katabolism	9
2.2. Tolueeni katabolism	10
3. Bakteriaalsed multikomponentsed monooksügenaasid (BMM-id)	13
3.1. Oksüdoreduktaasid	14
3.2. BMM-ide klassifikatsioon	15
3.3. Tolueeni lagundamisel osalevad geenid, nende struktuur ja lokalisatsioon.....	15
MATERJAL JA METOODIKA.....	19
4. Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamine ja fenotüübiline iseloomustamine	19
5. DNA manipulatsioonid.....	19
5.1 Totaalse ja plasmiidse DNA eraldamine	19
5.2. DNA fragmentide amplifitseerimine ja kontrollimine	19
5.3. Sekveneerimine ja nukleotiidsete järjestuste analüüs.....	21
6. Induktsioonikatsed tolueeniraja võtmeensüümide aktiivsuste määramiseks.....	21
6.1. Bensüülalkoholi dehüdrogenaas	22
6.2. Katehhooli 2,3-dioksügenaas.....	22
6.3. RNA eraldamine	22
6.4. qRT-PCR	23
TÖÖ EESMÄRGID.....	24
TULEMUSED	25
7. Tolueenilagundajate bakterite feno- ja genotüübiliste tunnuste üldiseloomustus	25
8. BMM-ide fülogeneetiline analüüs	28
8.1. Tolueeni monooksügenaasid (TMO-d)	28
8.2. Ksüleeni/tolueeni monooksügenaasid (XylA-d)	28
9. Katalüütiliste funktsioonide redundantsuse uurimine	32
9.1. Ensümaatiline aktiivsus	32
9.2. XylA ja TMO geenide ekspressioon mRNA tasemete põhjal.....	35
10. Perekond <i>Acinetobacter</i> ja tolueeni lagundamine	36
KATSETULEMUSTE ARUTELU	38

KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED	42
SUMMARY.....	43
TÄNUAVALDUSED.....	44
KIRJANDUSE LOETELU.....	45
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	56

LÜHENDID

BA-	Bensüülalkohol
BADH -	Bensüülalkoholi dehüdrogenaas
BMM -	Bakteriaalne multikomponentne monooksügenaas
CELMS-	Keskkonna ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsoon (<i>Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains</i>)
C12O -	Katehhooli 1,2-dioksügenaas
C23O -	Katehhooli 2,3-dioksügenaas
CoA -	Koensüüm A
DO -	Dioksügenaas
EDTA -	Dinaatriumetüleendiamiintetraatsetaat
Gen -	Gentisaat
G12O -	Gentisaadi 1,2-dioksügenaas
LmPH -	Multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suur subühik
mPH -	Multikomponentne fenooli hüdroksülaas
PCA-	Protokatehhuaat
PH -	Fenooli hüdroksülaas
PHB-	<i>p</i> -hüdroksübensoaat
Phe-	Fenool
P34O -	Protokatehhuaadi 3,4-dioksügenaas
P45O -	Protokatehhuaadi 4,5-dioksügenaas
RKF-	Redundantne katalüütiline funktsioon
RVE-	Rakuvaba ekstrakt
SSCP -	Üksikahela konformatsiooniline polümorfism (<i>Single-strand conformation polymorphism</i>)
<i>tbc1ABCDEF</i> -	Fenooli/kresooli hüdroksülaasi kodeerivad geenid
<i>tbc2ABCDEF</i> -	Tolueeni/benseeni/klorobenseeni 2-monooksügenaasi kodeerivad geenid
Tbc1m -	Fenooli hüdroksülaas <i>Burkholderia</i> sp. tüvest JS150
Tbc2m -	Tolueeni/benseeni/klorobenseeni 2-monooksügenaas <i>Burkholderia</i> sp. tüvest JS150

Tb2m -	Tolueeni/benseeni 2-monooksügenaas <i>Burkholderia</i> sp. tüvest JS150
Tb4m -	Tolueeni/benseeni 4-monooksügenaas <i>Burkholderia</i> sp. tüvest JS150
<i>tbmABCDEF</i> -	Tolueeni/benseeni 2-monooksügenaasi kodeerivad geenid
Tbu -	Tolueeni 3-monooksügenaas <i>Ralstonia pickettii</i> tüvest PKO1
<i>tbuAIUBVA2C</i> -	Tolueeni 3-monooksügenaasi kodeerivad geenid
TCA-	Tsitraaditsükkel
TDO -	Tolueeni dioksügenaas
Tln-	Tolueen
TMO -	Tolueeni monooksügenaas
Tmo -	Tolueeni 4-monooksügenaas <i>Pseudomonas mendocina</i> tüvest KR1
<i>tmoABCDE</i> -	Tolueeni 4-monooksügenaasi kodeerivad geenid
T2MO -	Tolueeni 2-monooksügenaas
T3MO -	Tolueeni 3-monooksügenaas
T4MO -	Tolueeni 4-monooksügenaas
Tom -	Tolueeni monooksügenaas <i>Burkholderia vietnamiensis</i> tüvest G4
<i>tomA0A1A2A3A4A5</i> -	Tolueeni 2-monooksügenaasi kodeerivad geenid
ToMO -	Mittespetsiifiline tolueeni/ <i>o</i> -ksüleeni monooksügenaas
TpMO -	Tolueeni <i>p</i> -monooksügenaas
Tou -	Tolueeni monooksügenaas <i>Pseudomonas stutzeri</i> tüvest OX1
<i>touABCDEF</i> -	Tolueeni/ <i>o</i> -ksüleeni monooksügenaasi kodeerivad geenid
<i>touKLMNOP</i> -	Fenooli hüdroksülaasi kodeerivad geenid <i>Pseudomonas stutzeri</i> tüvest OX1
XMO -	Ksüleeni monooksügenaas
<i>xylAM</i> -	Ksüleeni monooksügenaasi kodeerivad geenid
<i>xylB</i> -	Bensüülalkoholi dehüdrogenaasi kodeeriv geen
<i>mTol</i> -	<i>m</i> -toluaat
<i>pCre</i> -	<i>p</i> -kresool
<i>oCre</i> -	<i>o</i> -kresool
<i>mCre</i> -	<i>m</i> -kresool
ND -	Ei määratud (<i>Not detected</i>)

SISSEJUHATUS

Aromaatseid süsivesinikke e. areene lagundavate bakterite hulgas on kirjeldatud piiratud arv nn. tüüptüvesid, mis viitab nii nende tüvede erilistele kataboolsetele omadustele kui ka laialdasele looduslikule levikule. Eriti iseloomulik on see merekeskkonnast pärit mikroobidele ning seda just mingi(te) ühendi(te) toime poolt põhjustatud selektiivse surve tõttu. Sama on näidatud ka bakterikoosluste uurimisel molekulaarsete meetoditega, näiteks pärast tankeritega juhtunud õnnetusi. Tekib küsimus, millised kataboolsed eeldused tagavad mingile mikroobirühmale vastupidavuse kindlates keskkonnatingimustes ja võimaldavad neil kiiresti lülituda ümber uute keskkonda sattuvate aromaatsete ühendite efektiivsele biodegradatsioonile. Looduslik foonitasemeline bioremediatsioon toimib pidevalt tänu evolutsiooniliselt väljakujunenud funktsionaalsetele „spetsialist-geenidele“. Evolutsiooni käigus võivad need kataboolsed geenid muutuda selliselt, et sama katalüütilist funktsiooni võimaldatakse veelgi efektiivsemalt ja paindlikumalt täita.

Käesolevas töös valiti mudelsubstraadiks tolueen kui üks kütustes leiduv aroomne süsivesinik. Keskenduti selle lagundamises osalevate võtmeensüümide ja neid kodeerivate geenide uurimisele. Tolueeni nagu ka fenooli katabolismis on tähtsal kohal multikomponentsed monooksügenaasid. Need ensüümid on oma struktuurilt sarnased ning on transkribeeritud ühe operoni poolt, mis kodeerib nelja kuni kuut polüpeptiidi. Multikomponentsed monooksügenaasid võivad erineda substraadi spetsiifilisuse poolest, ja üldjuhul see nii ka on. Fenoolsete ühendite mono- ja dihüdrosüleerimise reaktsioonide läbiviijatena on multikomponentsed monooksügenaasid tähtsal kohal ka biotehnoloogias. Seda näiteks erinevate aromaatsete antioksidantide tootmises, kuna viimaste saamine keemiliselt on kulukas. Tunduvalt odavam on kasutada nimetatud protsessides multikomponentsete monooksügenaaside poolt toodetud vahemetaboliite. Seega on neid ensüüme omavate looduslike bakteritüvede lähem uurimine vajalik nii geneetilise mitmekesisuse selgitamiseks, loodusliku bioremediatsiooni protsessi mõistmiseks, aga nad on olulisel kohal ka oksüdatiivset stressi maandavate ühendite tootjatena biomeditsiinis.

Tulenevalt ülalesitatust uuriti käesolevas töös varem Läänemerest isoleeritud multikomponentseid monooksügenaase omavate ning fenooli/tolueeni lagundavate tüvede kollektsiooni, samuti analüüsiti tuvastatud monooksügenaaside geenide fülogeneetilist sugulust ja funktsionaalset ekspressiooni.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Läänemere ökosüsteemi ohustavad aromaatsed süsivesinikud ja nende potentsiaalsed degradeerijad

Läänemeri on peaaegu täielikult ümbritsetud maismaaga ning on seetõttu sisemerena saastamise suhtes äärmiselt tundlik. Merevette satuvad reoained nii inim- kui tööstustegevuse tagajärjel, aga ka sademete kujul atmosfäärist. Üheks tõsisemaks saasteallikaks võib pidada tihedat laevaliiklust, mille käigus satub pidevalt vette toornaftat (Gunkel ja Gassmann, 1980; Reinheimer, 1998). Toornafta ei ole homogeenne materjal. Selles leiduvad keemilised ühendid jagunevad peamiselt nelja gruppi, milleks on: küllastunud süsivesinikud, aromaatsed süsivesinikud, resiinid ja asfalteenid. Kolm viimast on kergõlide peamised komponendid. Küllastunud süsivesinikud moodustavad küll suurima fraktsiooni, kuid aromaatsete süsivesinike, resiinide ja asfalteenide tähtsust ei tohiks alahinnata, kuna need ühendid on tunduvalt mürgisemad ja bioloogilisele lagundamisele vastupidavamad, mistõttu võib nende mõju keskkonnale olla palju pikemaajalisem (Head *et al.*, 2006).

Kui sajang tagasi isoleeriti esimesed bakterid, kes kasutasid erinevaid süsivesinikke ainsa süsiniku ja energia allikana, siis 2006. aasta ülevaateartiklis kirjeldatakse juba 79 perekonna esindajaid, kes saavad hakkama erinevate süsivesinike lagundamisega (Head *et al.*, 2006). Kultiveerimine võimaldab kindlaks teha uuritava tüve füsioloogilised, geneetilised ja kataboolsed omadused. Kultiveerimisel mittepõhinevad meetodid lubavad aga tuvastada suurt hulka fülogeneetiliselt erinevaid baktereid mitmesugustest (saastunud) keskkondadest. Nii nagu suurem osa süsivesinike lagundajaid on isoleeritud mereveest, on ka paljude aromaatsete süsivesinike degradeerijate (*Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* ja *Nocardia*) looduslikuks keskkonnaks meri (Cao *et al.*, 2009).

Seni on Läänemerd uuritud pigem koosluse baasil, vähem biodegradatsiooni võtmes. Sõltuvalt meetodist on saadud erinevaid tulemusi. Näiteks Koskineni ja kaastöötajate poolt läbiviidud uuringud PCR ja 454 sekveneerimismeetodit kasutades näitasid, et enim levinud bakterihõimkond Läänemeres oli *Gammaproteobacteria*, mis moodustas 50% kõigist leitud järjestustest. Hõimkonnad *Flavobacteria* (13%), *Betaproteobacteria* (7%), *Alphaproteobacteria* (6%) ja *Actinobacteria* (4%) olid samuti kõigis proovides esindatud. Tuvastatud 169 perekonnast kuulus perekonda *Pseudomonas* ligikaudu 45% leitud liikidest. *Pseudomonaade* esines kõigis proovides ning domineerisid nad just pinnavees. Teine levinum perekond oli *Oleispira* (9%), aga esindatud olid ka perekonnadesse *Flavobacterium* (3%),

Oceanospirillum (3%), *Rubritalea* (3%), *Rhodobacter* (3%), *Fluviicola* (3%) ja *Sulfurimonas* (3%) kuuluvad bakterid (Koskinen *et al.*, 2011).

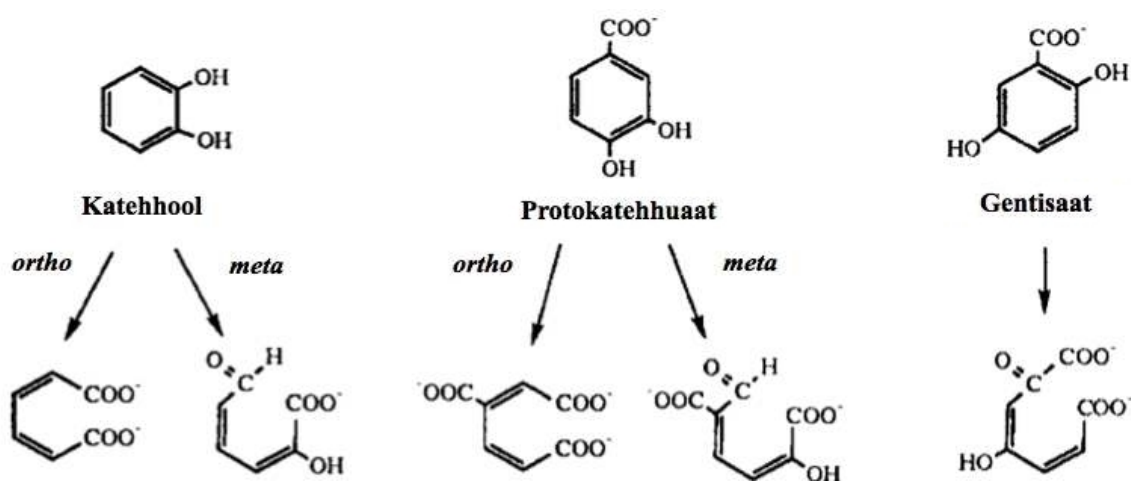
Brettar ja kolleegid kasutasid 16S rRNA ja 16S rDNA SSCP (*Single-strand conformation polymorphism*) sõrmejälgedepõhiseid meetodeid. DNA-põhiste sõrmejälgede alusel suudeti tuvastada hõimkond *Actinobacteria*. Hõimkonnad *Deltaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria* ja *Deferribacteres* tehti kindlaks aga hoopis RNA-põhiste sõrmejälgede abil. Mitmed bakterihõimkonnad tuvastati peamiselt pinnavee proovidest. Nendeks olid näiteks: *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* ning *Alpha*- ja *Betaproteobacteria* (Brettar *et al.*, 2012). Tiiriku jt. poolt läbiviidud töös, kus uuriti samu proovipunkte, mida käesoleva magistritöö puhulgi ja kasutati samuti 16S rRNA-põhist meetodit nagu Brettari ja kolleegide töös, leiti, et kõigi pinnavee proovide puhul olid domineerivateks lisaks *Actinobacteria* 'le ka hõimkonnad *Proteobacteria* ja *Bacteroidetes* (Tiirik *et al.*, 2014).

2. Aromaatsete ühendite aeroobsed kataboolsed rajad bakterites

Peamiste aromaatsete ühendite katabolismiradade uuringud bakterites on näidanud, et esmaseid konversiooni etappe viivad läbi erinevad ensüümid. Tekkivateks dihidroksüleeritud vaheühenditeks on katehhool, protokatehhuaat ja gentisaat (Joonis 1). Katehhool ja protokatehhuaat suunatakse kas *ortho*- (tuntud ka kui β -ketoadipaadi rada) või *meta*-lagundamisratta (Harayama ja Renik, 1989; Van der Meer *et al.*, 1992). Kahe paralleelse *ortho*-lagundamisraja esinemist katehhooli ja protokatehhuaadi kataboliseerimisel *Pseudomonas putida* rakkudes näitasid juba Ornston ja Stanier (1966). Katehhooli ja protokatehhuaadi benseenituuma avamise etappe katalüüsivad vastavalt katehhooli 1,2-dioksügenaas (C12O; EC 1.13.11.1.) ja protokatehhuaadi 3,4-dioksügenaas (P34O; EC 1.13.11.3) (Van der Meer, 1997). C12O ning P34O lagundavad aromaatse tuuma vastavalt *cis,cis*-mukonaadiks ja 3-karboksü-*cis,cis*-mukonaadiks, mis sisenevad põhiainevahetusse suksinaadi ja atsetüül-CoA-na (Joonis 1). Katehhooli ja protokatehhuaadi aromaatsete tuumade *meta*-lagundamine toimub vastavalt katehhooli 2,3-dioksügenaasi (C23O; EC 1.13.11.2) ja protokatehhuaadi 4,5-dioksügenaasi (P45O; EC 1.13.11.8) vahendusel. Pärast benseeni tuuma lõhkumist moodustub *meta*-lagundamisel 2-hüdroksümukonaat-6-semialdehüüd, mis läheb põhiainevahetusse püruvaadi ja atsetüül-CoA-na (Harwood ja Parales, 1996). Gentisaadi degradeerimist katalüüsib gentisaadi 1,2-dioksügenaas (G12O; EC 1.13.11.4) ja moodustub maleüülpüruvaat. Metüül-asendusrühmaga aromaatsete substraadid lagundatakse üldjuhul *meta*-rajas C23O osalemisel. Asendusrühmadeta või kloori sisaldavate

aromaatsete ühendite degradeerimine toimub aga *ortho*-rajas (Klecka ja Gibson, 1981; Schmidt *et al.*, 1985).

Looduslik mikroobide kasvukeskkond on substraatide segu, mis tähendab mitmete erinevate radade koos- või järkjärgulist (diauksiaga) kasutamist. Üldiselt arvatakse, et *ortho*- ja *meta*-rada ei funktsioneeru samaaegselt toksiliste vaheproduktide kogunemise tõttu (Knackmuss ja Hellwig, 1978). Nende radade erineval lokalisatsioonil, näiteks kromosoomis ja plasmiidis, võivad aromaatsed tuuma erinevad lagunemisradad segasubstraatide olemasolul siiski koos eksisteerida. Sellist võimalust on näidatud *P. fluorescens*'i multiplasmiidises tüves PC20, kus fenooli ja naftaleeni kasutamine toimub samaaegselt erinevaid lagunemisradu kasutades (Heinaru *et al.*, 2009). Loodus on kasvusubstraatide hulga poolest vaene keskkond, mistõttu võib oletada, et madalatel kontsentratsioonidel ei teki vastuolu erinevate katabolismiradade avaldumisel. Seda on kirjanduse andmetel ka näidatud (Kovárová-Kovar ja Egli, 1998).



Joonis 1. Aromaatsed ühendid metaboliseeritakse katehooliks, protokatehhuaadiks ning gentisaadiks. Aromaatse tuuma lagundamine leiab aeroobsetes tingimustes aset kas *ortho*-, *meta*- või gentisaadi lagunemisradu mööda (Harwood ja Parales, 1996 kohandatud joonis).

2.1. Fenooli katabolism

Fenool (hüdrosübenseen) on värvusetu, kristalne aine, mis lahustub vees ning orgaanilistes lahustites. Fenooli süntees toimub tööstuses tavaliselt kiviõli tõrva ekstraheerimisel. Seda saadakse veel ka klorobenseeni ja naatriumhüdrosiidi vahelises reaktsioonis, tolueni oksüdatsioonil ning sünteesil benseenist ja propüleeni. Fenooli kasutatakse keemiatööstuses, õli ning kiviõli töötlemisel ja metallurgias. Looduslikult toodavad taimed fenooli biosünteesiprotsessis, aga seda tekib ka orgaanilise aine lagunemisel ning UV-kiirguse mõjul

taimede hemitselluloosis leiduvatest aminohapetest (Bate-Smith, 1962; Bruce *et al.*, 1987; <http://pollution.unibuc.ro/?substance=47>).

Fenooli hüdroksülaas (PH; EC 1.14.13.7) katalüüsib esimest reaktsiooni mikroobses fenooli lagundamises, sisestades hapnikuaatomi aromaatsesse ringi ja luues katehhooli (Dagley ja Gibson, 1965). PH-d võivad olla nii multikomponentsed kui ka ühekomponendilised. Looduses levinuimad on siiski esimesed (Peters *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1998; Futamata *et al.*, 2001).

Multikomponentseid fenooli hüdroksülaase (mPH) on isoleeritud ja kirjeldatud erinevate bakterite puhul, erinevate autorite poolt (Herrmann *et al.*, 1995; Bertoni *et al.*, 1996, 1998; Arengi *et al.*, 2001; Cafaro *et al.*, 2004;). Kõigil mPH-del on sarnane struktuur: nad koosnevad dimeerisest hüdroksülaasist, kofaktor-sõltumatust regulaatorvalgust ning FAD-flavoproteiini [2Fe-2S] reduktaasist, mis varustab hüdroksülaasi elektronidega läbi NADH (Leahy *et al.*, 2003; Notomista *et al.*, 2003). *Pseudomonas* sp. tüve CF600 puhul on näidatud, et mPH kodeeritakse kuue avatud lugemisraami poolt (*dmpKLMNOP*) (Powlowski ja Shingler, 1994). Arvatakse, et DmpL-DmpN-DmpO valgud moodustavad oksügenaasi. DmpN on mPH suurim subühik (LmPH), kus paikneb ka kataboolne sait (Qian *et al.*, 1997; Enroth *et al.*, 1998).

2.2. Tolueeni katabolism

Keskkonda satub tolueen (metüülbenseen) nii looduslikest kui antropogeensetest allikatest. Looduslikult leidub tolueeni naftas ja kivisöes. See on ka peamine bensiini koostisosa (Cline *et al.*, 1991; Sinninghe Damste *et al.*, 1992; Koppmann *et al.*, 1997).

Benseeni tuuma keemilise stabiilsuse tõttu on esimene samm tolueeni lagundamises kõige raskem. Aeroobsetes tingimustes kasutatakse tuuma destabiliseerimiseks hapnikku ning valmistatakse molekul ette edasiseks katabolismiks. Osadel bakteritel on *cis*-dihüdrodioolprodukti formeerimiseks dioksügenaas (TDO-rada), teistel aga monooksügenaasid, mis viivad läbi esimest astet tolueeni oksüdatsioonil, kas *ortho*-, *meta*- või *para*-asendis (TMO-d). Alternatiiviks on olukord, kus tolueeni metüülgrupp oksüdeeritakse, mis viib katehhooli tekkeni, nagu see toimub TOL plasmiidis (ksüleeni/tolueeni monooksügenaasid). Tolueeni 4-monooksügenaasi (T4MO) esinemisel võib tolueeni lagundamine toimuda üle *p*-kresooli (4-hüdroksütolueen-i), mis viib *p*-kresooli metüülhüdroksülaasi olemasolul (metüülrühm oksüdeeritakse) protokatehhuaadi tekkeni. See

The diagram illustrates the metabolic pathways of toluene degradation by various bacteria. Toluene (CC1=CC=CC=C1) is the starting point. Several pathways are shown, leading to different intermediates and final products.

Top Pathway (P. putida PaW1, pVWW0): Toluene is converted to Benzyl alcohol (CC1=CC=CC=C1CO), then to Benzaldehyde (CC1=CC=CC=C1C=O), and finally to Benzoic acid (CC1=CC=CC=C1C(=O)O).

Middle Pathway (P. putida F1, Burkholderia sp. JS150): Toluene is converted to Toluene-*cis*-dihydrodiol (CC1=CC=CC=C1C(O)C(O)C), which then leads to 3-methylcatechol (CC1=CC(=C(C=C1)O)O).

Bottom Pathway (B. cepacia G4, Burkholderia sp. JS150): Toluene is converted to *o*-cresol (CC1=CC=CC=C1O), which then leads to *m*-cresol (CC1=CC=C(C=C1)O), and finally to *p*-cresol (CC1=CC=C(C=C1)O).

Central Pathway (Burkholderia sp. JS150): Toluene is converted to *p*-cresol, which then leads to *p*-hydroxybenzyl alcohol (CC1=CC=C(C=C1)CO), *p*-hydroxybenzaldehyde (CC1=CC=C(C=C1)C=O), *p*-hydroxybenzoic acid (CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O), and finally to Protocatechuic acid (CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O).

Final Products: The pathways converge on several common intermediates: 3-methylcatechol, 4-methylcatechol (CC1=CC=C(C=C1)O), and 4-methylprotocatechuic acid (CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O). These intermediates are then converted to Mukonaic semialdehyde (CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O), which is further converted to Pyruvate and Acetaldehyde, and finally to CO₂ and H₂O.

Other Pathways: Toluene can also be converted to *p*-cresol by *P. mendocina* KR1, which then leads to *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-hydroxybenzoic acid (CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O).

Chemical Structures: The diagram shows the chemical structures of the following compounds: Toluene, Benzyl alcohol, Benzaldehyde, Benzoic acid, Toluene-*cis*-dihydrodiol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, Protocatechuic acid, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol, 4-methylprotocatechuic acid, Mukonaic semialdehyde, Pyruvate, Acetaldehyde, CO₂, and H₂O.

Joonisel 2 on toodud peamised teadaolevad tolueeni lagundamisrajad ning bakteritüved, kellest need on leitud. *Pseudomonas putida* tüvi F1 kodeerib TDO-d, mis hüdroksüleerib tolueeni nii *ortho*- kui *meta*-positsioonis ning raja vaheprodukt 3-metüülkatehhool lagundatakse *meta*-rajas (Gibson *et al.*, 1970; Parales *et al.*, 2008).

11

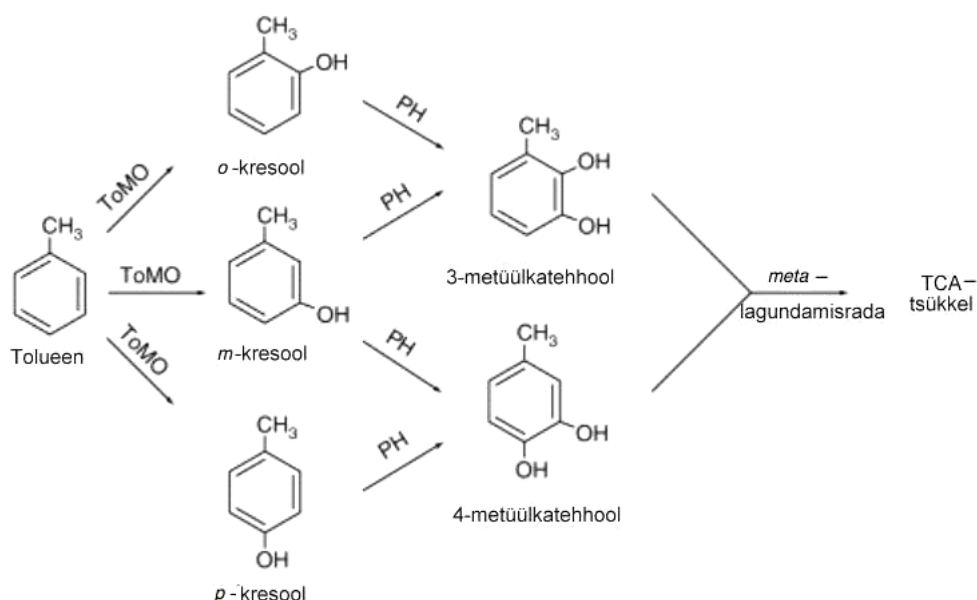
Tolueeni 3-monooksügenaas (T3MO) on iseloomulik *Ralstonia pickettii* tüvele PKO1. T3MO abil hüdroksüleeritakse tolueen *meta*-positsioonis. Tekib *m*-kresool, millest PH abil saadakse 3-metüülkatehhoor, mis suunatakse *meta*-lagundamisratta (Olsen *et al.*, 1994). Hiljem aga näidati, et T3MO sarnaneb T4MO-ga - mõlemad hüdroksüleerivad tolueeni valdavalt *p*-asendis. Seetõttu nimetati ensüüm T3MO ümber tolueeni *p*-monooksügenaasiks (TpMO-ks) (Fishman *et al.*, 2004).

Burkholderia sp. tüvi JS150 on võimeline lagundama tervet rida erinevaid aromaatsaid süsivesinikke. On näidatud, et kõnealune tüvi ekspresseerib vähemalt kolme erinevat dioksügenaasi. Neist tolueeni lagundav sarnaneb *P. putida* tüve F1 dioksügenaasile (Haigler ja Spain, 1991). Tüvi JS150 ekspresseerib ka nelja erinevat benseeni tuuma lagundamisrada, mille hulka kuuluvad nii *ortho*- kui *meta*-lagundamisrajad. Lisaks kannab JS150 mitut monooksügenaasi vahendatud rada tolueeni lagundamiseks. Seega saab tüves JS150 tolueeni konverteerida algselt kas tolueen-*cis*-dihüdrodiooni, *o*-kresooliks või *p*-kresooliks. Kõik kolm ühendit konverteeritakse seejärel 3- või 4-metüülkatehhooriks ning nende edasine degradeerimine leiab aset *meta*-rajas C23O abil (Haigler *et al.*, 1992). Kuna kõiki teadaolevaid tolueeni mono- ja dioksügenaase indutseeritakse tolueenil kasvu käigus, siis paistab, et mitmed rajad funktsioneerivad koos ning tolueeni võidakse lagundada isegi mitmeid teid mööda samal ajal (Parales *et al.*, 2008).

Pseudomonas mendocina tüvi KR1 omab T4MO-d, mis lisab hüdroksüülrühma 4. süsiniku juurde, saadakse *p*-kresool. Seejärel hüdroksüleeritakse metüülrühm ning tekib *p*-hüdroksübensüülalkohol, millest omakorda *p*-hüdroksübensaldehüüd. Sellest *p*-hüdroksübensoaat ja edasi juba protokatehhuaat, mis lagundatakse P34O poolt (Whited ja Gibson, 1991).

Pseudomonas putida tüve mt-2 (tuntud ka kui PaW1) iseloomustab TOL plasmidi pWW0 poolt kodeeritud ksüleeni monooksügenaas (XMO; tolueeni kõrvalahela monooksügenaas), mis oksüdeerib metüülrühma. Saadakse bensüülalkohol, millest bensüülalkoholi dehüdrogenaasi (BADH) toimel tekib bensaldehüüd, mis oksüdeerub järgnevalt bensoadiks. Viimane annab toluuadi dioksügenaasi abil bensoaat-*cis*-1,2-dihüdrodiooni ja edasi toluuadi *cis*-dihüdrodiooni dehüdrogenaasi abil juba katehhooli, mis lagundatakse C23O abil *meta*-rada mööda (Worsey ja Williams, 1975).

Joonisel 3 on toodud *Pseudomonas stutzeri* tüve OX1 poolt kodeeritud mittespetsiifiline TMO rada. Tema esialgne monooksügenaas ehk tolueeni/*o*-ksüleen monooksügenaas (ToMO), mis konverteerib tolueeni katehhooliks, on kõige sarnasem nii järjestuse kui struktuuri poolest T4MO-ga, aga see ensüüm ei ole erinevalt tüvede G4, PKO1 ja KR1 tolueeni monooksügenaasidest regioonispetsiifiline, kuna katalüüsib kõigi kolme kresooli isomeeri formeerimist (Bertoni *et al.*, 1996). Need konverteeritakse seejärel teise monooksügenaasi reaktsiooni ehk PH abil 3- ja 4-metüülkatehhooliks. Seda rada kodeeritakse kromosomaalselt (Parales *et al.*, 2008). Substraadipetsiifilisuse ja kineetiliste parameetrite uurimine on näidanud, et vastupidiselt PH-le on ToMO enam efektiivsem mitteoksüdeeritud substraatide suhtes ja katehhooli moodustumine toimub vaid mõlema monooksügenaasi olemasolul (Parales *et al.*, 2008; Tinberg *et al.*, 2011).



Joonis 3. *Pseudomonas stutzeri* tüve OX1 mittespetsiifiline monooksügenaas-vahendatud tolueeni degradatsioonirada. Ära on toodud vaheühendid ja ensüümid. Ensüümid: ToMO - tolueeni/*o*-ksüleen monooksügenaas; PH - fenooli/kresooli hüdroksülaas (Parales *et al.*, 2008 kohandatud joonis).

3. Bakteriaalsed multikomponentsed monooksügenaasid (BMM-id)

BMM-id on ensüümide perekond, mis viivad läbi suurt hulka hüdroksüleerimisreaktsioone (Park *et al.*, 2007; Feingersch *et al.*, 2008; Torres Pazmino *et al.*, 2010), kuhu kuuluvad ka aromaatsete ühendite mono- ja dihüdroksüleerimisreaktsioonid (Parales *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002). BMM-id koosnevad tavaliselt 200- kuni 250-kDa-suurusest

dimeersest hüdroksülaasi komponendist, 10- kuni 16-kDa-suurusest regulaatorvalgust (Bailey *et al.*, 2008) ning reduktaasist, mis on vastutav elektronide transpordi eest NADH-lt hüdroksülaasile (Lazaridis ja Karplus, 1999; Notomista *et al.*, 2003). Hüdroksülaasi komponendis on süsivesinike hüdroksüleerimise sait ja see sisaldab kahte või kolme allühikut dimeerses konfiguratsioonis ($\alpha_2\beta_2[\gamma_2]$). Katalüütiline tsenter sisaldab 2 Fe-aatomit koordineeritult karboksüleeriva sillaga α -subühikus eristuva 4-heeliks kimbu struktuuris. Kõik komponendid on ensümaatiliseks aktiivsuseks vajalikud. Multikomponentsed ensüümid on kodeeritud vähemalt nelja või enam geeni sisaldavate operonide poolt (Holmes ja Coleman, 2008).

3.1. Oksüdoreduktaasid

Oksüdoreduktaasid on suurim ja mitmekesiseim ensüümide rühm, millest suur osa kasutab molekulaarset hapnikku substraadina (oksügenaasid) või elektroniaktseptorina (oksüdaasid) (Bugg 1997; Nolan ja O'Connor, 2008). Neil ensüümidel on lai substraadispetsiifika ning tugev regiooni- ja stereospetsiifika (Li *et al.*, 2002).

Oksügenaasid on looduses väga levinud ning osalevad suure hulga ühendite metabolismis (Burton 2003; Ullrich ja Hofrichter, 2007). Monooksügenaasid katalüüsivad ühe O₂-aatom viimist orgaanilise substraadi koosseisu ning teise redutseerimist veeks. Need ensüümid kasutavad üldiselt NADH või NADPH kofaktoreid ning võivad olla metall-, heem- või flaviinsõltuvad (Bugg, 1997; Burton, 2003; Ullrich ja Hofrichter, 2007). Dioksügenaaside puhul inkorporeeritakse mõlmad O₂-aatomid orgaanilise substraadi koosseisu (Burton, 2003) ning need jagunevad kahte peamisesse klassi: heemsõltuvad raud-väävel ning Rieske-tüüpi mitte-heemsõltuvad raud-väävel dioksügenaasid. Viimastest suurem osa on NADH-sõltuvad (Wackett ja Hershberger, 2001; Burton, 2003).

Oksüdaasid katalüüsivad substraadi oksüdatsiooni ilma hapniku sisestamiseta otse ühendi koosseisu (Burton, 2003; Ullrich ja Hofrichter, 2007). Need ensüümid reageerivad molekulaarse hapnikuga kahe-elektronilises oksüdatsiooniprotsessis, kus produtseeritakse vesinikperoksiid, mis toimib sihtmärksubstraadile. Oksüdaasid on tihtipeale metall-, heem-, või flaviinsõltuvad ning paljud neist on võimelised ilma eksogeensete kofaktoriteta katalüüsi läbi viima (Burton, 2003; Seo *et al.*, 2003; Claus ja Decker, 2006; Ullrich ja Hofrichter, 2007).

3.2. BMM-ide klassifikatsioon

Monooksügenaasid klassifitseeritakse katalüütiliseks aktiivsuseks vajalike kofaktorite järgi: heem-(Urlacher *et al.*, 2004), flaviin- (Van der Werf, 2000), vask- (McGuirl ja Dooley, 1999) ja mitteheemsed raud-sõltuvad monooksügenaasid. Viimased kasutavad oksüdatiivseks aktiivsuseks kahte Fe-aatomit kofaktorina (Murreil *et al.*, 2000). Lahustuvad kahe Fe-aatomiga monooksügenaasid jaotatakse nende struktuuri ja vähesel määral ka substraadispetsiifilisuse järgi 4 rühma: lahustuvad metaani monooksügenaasid (I), alkeeni monooksügenaasid (II), fenooli hüdroksülaasid (III) ja neljakomponendilised alkeeni/aromaatsed monooksügenaasid (IV) (Leahy *et al.*, 2003; Mukherjee ja Roy, 2013).

Lähem fülogeneetiline analüüs kahe Fe-aatomiga monooksügenaaside komponentidele (α -, β , NADH oksüdoreduktaas ja ferredoksiin) on tehtud Leahy töögrupi poolt. See näitas, et α - ja β -oksügenaasi subühikud on paralooogsed valgud, mis pärinevad geeniduplikatsiooniga eellasest, kellest hilisem lahknemine andis katalüütilise α -oksügenaasi ja struktuurse β -oksügenaasi. Oksüdoreduktaasi ja ferredoksiini komponendid on omandatud horisontaalse geenitriivi abil mittesugulasgeenide poolt kodeeritud valkudena (Leahy *et al.*, 2003).

3.3. Tolueeni lagundamisel osalevad geenid, nende struktuur ja lokalisatsioon

Lähemalt iseloomustame III ja IV rühma BMM-e, mis on mõlemad seotud fenooli ja tolueeni lagundamisega. BMM-de III rühma kuuluvad PH-d on 3-komponentsed oksügenaasid, mis hüdroksüleerivad fenoolse substraadi katehholiks. Multikomponentsetest PH-dest Dmp *Pseudomonas* sp. tüvest CF600 ja tolueeni lagundamisel osalev T2MO (Tom) *Burkholderia vietnamiensis*'e tüvest G4 sarnanevad struktuurselt ja geneetiliselt (Nordlund *et al.*, 1990). Tüve G4 T2MO koosneb katalüütilisest hüdroksülaasist, flavo-raud-väävel reduktaasist ja väikesest valgust (Newman ja Wackett, 1995). Hüdroksülaas kodeeritakse *tomA1*, *tomA3* ja *tomA4* ning reduktaas *tomA5* poolt (Shields ja Francesconi, 1996; Parales *et al.*, 2008) (Joonis 4). Kõik tolueeni degradeerimiseks vajalikud geenid G4 tüves paiknevad suurel, iseülekanduval plasmiidil (TOM) (Shields *et al.*, 1995; Shields ja Francesconi, 1996; Parales *et al.*, 2008). C23O kodeeritakse *tomB* poolt. Nii PH-d kui ka T2MO katalüüsivad fenooli ja metüleeritud fenoolide hüdroksüleerimist (Parales *et al.*, 2008).

Sarnast laia substraadispetsiifilisust (hüdroksüleerivad ka mitteaktiveeritud benseenituumaga ühendeid) omab ka tüvele JS150 iseloomulik tolueeni/benseeni 2-monooksügenaas (Tb2m) (Johnson ja Olsen, 1995). *Burkholderia* sp. tüve JS150 Tb2m kodeeritakse plasmiidsete

tbmABCDEF poolt (Shingler *et al.*, 1992) (Joonis 4). Järjestuseanalüüsi alusel arvatakse, et see ensüüm koosneb kolmest komponendist ning sarnaneb *B. vietnamiensis*'e tüve G4 T2MO-le, kuna katalüüsib tolueeni konversiooni *o*-kresooliks ja *o*-kresooli konversiooni 3-metüülkatehhoooliks (Johnson ja Olsen, 1995; Parales *et al.*, 2008). On leitud, et samal rekombinantsel plasmiidil paiknevad ka geenid tolueeni 4-monooksügenaasi (Tb4m) kodeerimiseks (Johnson ja Olsen, 1997). Tb4m geenid on paigutatunud *tbmR* ja *tbmABCDEF* klastrite vahele (Parales *et al.*, 2008). *tbc1ABCDEF* produktide puhul on arvatavasti tegu fenooli/kresooli hüdroksülaasiga, kuna need katalüüsivad *o*-kresooli oksüdeerimist 3-metüülkatehhoooliks, kuid ei oksüdeerid tolueeni (Kahng *et al.*, 2001). Peale *tbc1* klastrit paikneb teine monooksügenaasi geenide komplekt (*tbc2ABCDEF*), millelt sünteesitavad produktid omavad suurimat järjestushomoloogiat *R. pickettii* tüve PKO1 T3MO komponentidega (Byrne *et al.*, 1995). Nagu *tbm* klaster, paiknevad ka *tbc1-tbc2* klastrid samal kataboolsel plasmiidil (Johnson ja Olsen, 1995; Kahng *et al.*, 2001).

Pseudomonas putida F1 tüve TDO kodeerimiseks vajalikud geenid (*todC1C2BA*) paiknevad suurel kataboolsel saarel (Zylstra *et al.*, 1988; Zylstra ja Gibson, 1989). TDO koosneb kolmest valgulisest komponendist, milleks on: flavoproteiini reduktaas (kodeeritud *todA* poolt), Rieske-tüüpi raud-väävel ferredoksiin (kodeeritud *todB* poolt) ja katalüütiline oksügenaas (kodeeritud *todC1C2* poolt) (Subramanian *et al.*, 1979). C23O-d kodeerib *todE* (Klecka ja Gibson, 1981).

Neljakomponendilised aromaatsed monooksügenaasid (tolueeni 4-monooksügenaas, tolueeni 3-monooksügenaas, tolueeni/*o*-ksüleen monooksügenaas ja PH *Ralstonia eutropha* tüvest JMP134) kuuluvad BMM-de IV rühma (Leahy *et al.*, 2003).

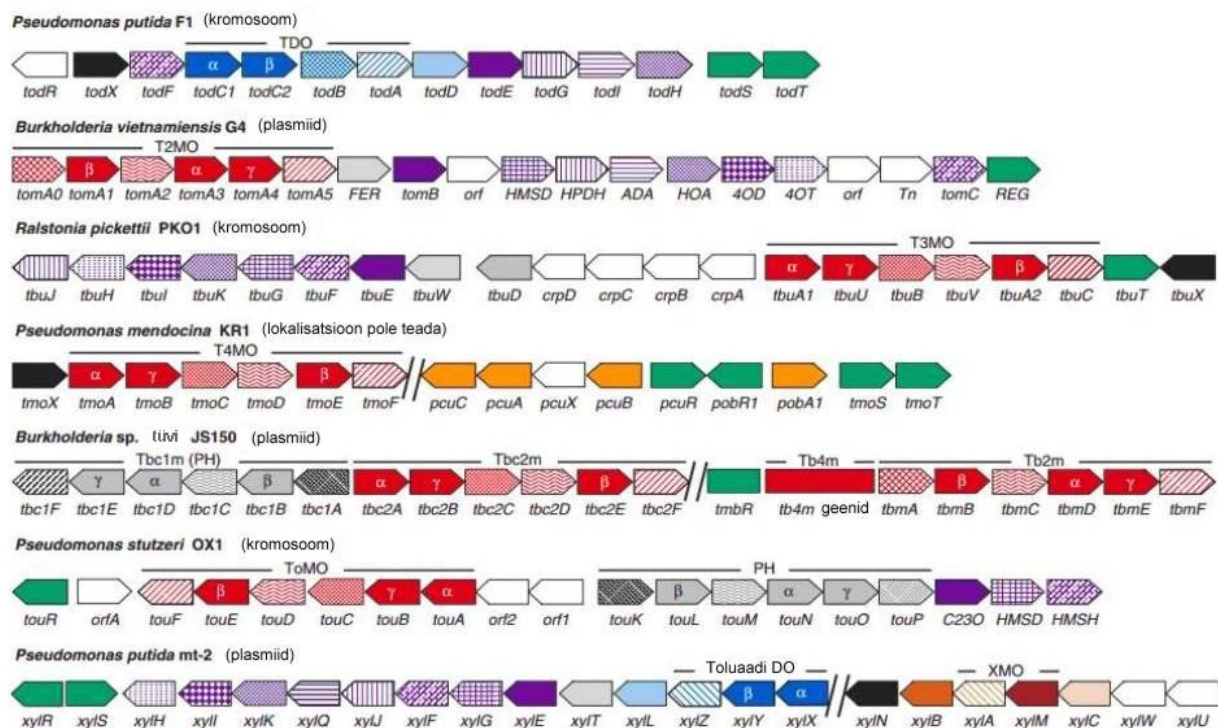
Pseudomonas mendocina tüve KR1 T4MO kodeeritakse viiest geenist (*tmoABCDE*) koosneva klatri poolt. *tmoA*, *tmoE* ja *tmoB* kodeerivad hüdroksülaasi kolme subühikut, *tmoC* Rieske-tüüpi raud-väävel ferredoksiini (Yen *et al.*, 1991; Pikus *et al.*, 1996), *tmoD* efektorproteiini (Studts ja Fox, 1999) ning *tmoF* NADH:ferredoksiin oksüdüreduktaasi komponenti (Yen ja Karl, 1992). Tmo hüdroksüleerib küll erinevat aromaatikat, kuid mitte fenoolseid ühendeid (Leahy *et al.*, 2003).

Ralstonia pickettii tüve PKO1 T3MO kodeeritakse kuue kromosomaalse geeni poolt: *tbuA1UBVA2C*. TbuA1 ja TbuA2 on T3MO hüdroksülaasi subühikud. TbuB ja TbuC funktsioneerivad kui T3MO ferredoksiini ja reduktaasi komponendid (Byrne *et al.*, 1995).

Põhinedes järjestushomoloogiale, arvatakse, et *tbuU* kodeerib ilmselt T3MO γ -subühikut ning TbuV funktsioneerib kui efektorvalk, mis stimuleerib T3MO aktiivsust (Parales *et al.*, 2008). Sarnaselt Tmo-le hüdroksüleerib Tbu aktiveerimata aromaatikasid, aga mitte fenoolseid (Olsen *et al.*, 1994).

Pseudomonas stutzeri tüve OX1 tolueeni ja *o*-ksüleeni lagundamiseks vajalikud geenid on kromosoomi poolt kodeeritud ning paiknevad 6-kb-suuruses lookuses, mis sisaldab kuut avatud lugemisraami ja kannab nime *tou* (Barbieri *et al.*, 1989; Bertoni *et al.*, 1998). Põhinedes valgujärjestuste analüüsile, arvatakse, et TouA näol võib tegu olla monooksügenaasi suure subühikuga. TouE ja TouB puhul aga teiste subühikutega, mida on tarvis monooksügenaasi aktiivsuseks (Bertoni *et al.*, 1998). Järjestuste võrdlemine ning biokeemilised analüüsid viitavad sellele, et TouC ja TouF omavad ferredoksiini ja reduktaasi komponentidele (osalevad elektronide ülekandes) sarnaseid omadusi (Bertoni *et al.*, 1998; Cafaro *et al.*, 2002). TouD järjestus sarnaneb teiste madalamolekulaarsete valkude järjestustega, mis osalevad hüdroksülaasi aktiivsuse stimuleerimisel teistes aromaatses lagundamisradades (Bertoni *et al.*, 1998). Geenid (*touK*; *touL*; *touM*; *touN*; *touO*; *touP*), mis kodeerivad multikomponentset fenooli/kresooli hüdroksülaasi, paiknevad 2 kb allavoolu ToMO kodeerivaid geene (Arengi *et al.*, 2001; Cafaro *et al.*, 2004). Tou ensüüm erineb Tbu ja Tmo ensüümidest kahel põhjusel: hüdroksüleerib fenoolseid ühendeid ning on nõrga stereospetsiifilisusega. Tbu ja Tmo eristuvad pärast Tou-d α -subühiku fülogeneetilisel puul ning on regioonispetsiifilised monooksügenaasid, mis ei hüdroksüleeri fenoolseid substraate. See viitab substraadi- ja regioonispetsiifilisuse hilisemale evolutsioneerumisele. Tom ja Tou monooksügenaasid on säilitanud eellasensüümi tunnused. (Leahy *et al.*, 2003). Vähem tuntakse siia rühma kuuluvat kromosomaalselt kodeeritud PH-d (Phl) tüvest JMP134.

Pseudomonas putida tüve mt-2 XMO on 2-komponendiline ensüüm, mida kodeeritakse TOL plasmidi poolt. XylM on membraaniseoseline katalüütiline komponent. XylA NADH:ferredoksiin reduktaas, millel on taimetüüpi [2Fe-2S] klaster ja sisaldab FAD-i (Suzuki *et al.*, 1991; Shaw ja Harayama, 1992).



Joonis 4. Tolueeni lagundamises osalevate geeniklastrite paiknemine aeroobsetes bakterites. Geenide lokalisatsioon (plasmiid või kromosoom) on toodud sulgudes. Valged kastid viitavad avatud lugemisraamidele (*orf*), millel ei ole teadaolevat funktsiooni, transposoonidele (Tn) või geenidele, mida ei ole tarvis antud raja toimimiseks. Värvilised kastid viitavad avatud lugemisraamidele, mis osalevad tolueeni lagundamisradade kodeerimises. Joonistamisel ei ole arvestatud geenide tegelikku suuruse suhet. Nööled näitavad transkriptsiooni suunda, geenide puhul, mida on kujutatud riskülikutena, ei ole transkriptsiooni suund teada. Kaks diagonaalset musta joont viitavad sellele, et geeniklastrid ei ole ühendatud. Värvide tähistused: sinine - dioksügenaasi geenid; helesinine - *cis*-dihüdroadiooli dehüdrogenaasi geenid; punane - multikomponentse tolueeni monooksügenaasi geenid; hall - fenooli/kresooli hüdroksülaasi geenid; pruun - ksüleenide monooksügenaasi geenid; punakaspruun - alkoholi dehüdrogenaasi geenid; helepruun - aldehüüdi dehüdrogenaasi geenid; oranž - *p*-kresooli lagundamisgeenid; lilla - *meta*-raja geenid; kahvatulilla - taimetüüpi ferredoksiini geenid; must - välismembraani kanali geenid; roheline - regulaatorgeenid. Lühendid: TDO - tolueeni dioksügenaas; T2MO - tolueeni 2-monooksügenaas; T3MO - tolueeni 3-monooksügenaas; T4MO - tolueeni 4-monooksügenaas; Tbc1m (PH) - fenooli hüdroksülaas; Tbc2m - tolueeni/benseeni/klorobenseeni 2-monooksügenaas; Tb4m - tolueeni/benseeni monooksügenaas; Tb2m - tolueeni/benseeni 2-monooksügenaas; ToMO - tolueeni/*o*-ksüleenide monooksügenaas; toluadi DO - toluadi dioksügenaas; XMO - ksüleenide monooksügenaas (Parales *et al.*, 2008 kohandatud joonis).

MATERJAL JA METOODIKA

4. Töös kasutatud bakteritüved, nende kasvatamine ja fenotüübiline iseloomustamine

Antud uurimistöös kasutati Läänemere erinevate piirkondade veest Eeva Heinaru poolt isoleeritud ja CELMS-i (*Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strains*) deponeeritud bakteritüvesid (Tabel 2). Bakterid kasvatati sõltuvalt tööülesannetest täissöötmetel LB või R2A (Difco™) ning mineraalainete seguga (M9 + mikroelemendid) minimaalsöötmetel erinevate süsiniku- ja energiaallikate lisamisega. Kasutatud substraadid ja nende kontsentratsioonid olid järgmised: Phe, *mTol* ja BA - 2,5 mM; *pCre*, *mCre*, *oCre*, PHB, PCA, Gen – 1,3 mM ning Tln – 1,0 mM. Tüved kasvatati toodud kontsentratsioonidel nii agaril kui ka vedelsöötmes 30°C juures.

5. DNA manipulatsioonid

5.1 Totaalse ja plasmiidse DNA eraldamine

Bakteriaalse genoomse DNA eraldamiseks kasvatati kultuurid täissöötmetel termostateeritud loksutis (180 pööret min⁻¹) üleöö, rakud tsentrifuugiti 11 000 x g juures 2 min, pesti 1 M NaCl-ga ja külmutati läbi. Saadud biomassist eraldati DNA *UltraClean* mikroobse DNA isoleerimiskomplekti (Mo Bio Laboratories, Inc., USA) abil vastavalt tootjapoolsele protokollile. Plasmide uuriti ja kontrolliti Connors ja Barnsley (1982) meetodika järgi. Bakteriaalne biomass kasvatati tahkel aromaatsiidide ühendite sisaldaval söötmetel ning korjati agari pinnalt 25% glütserooli. Plasmidne DNA eraldati biomassist pehme aluselise lüüsi abil. Pärast neutralisatsiooni K-atsetaadiga eemaldati rakujäägid ja põhiline kogus kromosomaalsest DNA-st. Supernatanti jäänud plasmidne DNA sadestati 96% etanooliga, lahustati Tris-EDTA 50/5 puhvris ja kanti 0,8% agarosgeelile. Lahustunud DNA-d uuriti elektroforeetilisel agarosgeelil pärast visualiseerimist etiidüümbromiidiga (0,5 µg ml⁻¹). Kõik UV-s visualiseeritud DNA-bändid, mis paiknesid kõrgemal või madalamal kui kromosomaalse DNA-bänd, defineeriti plasmiidideks.

5.2. DNA fragmentide amplifitseerimine ja kontrollimine

Edasiseks tööks vajalikud geenifragmendid amplifitseeriti PCR meetodil. PCR segu maht oli 25 µl, mis sisaldas 1x PCR puhvrit (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween 20), 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl₂, igat nukleotidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) lõppkontsentratsioon 200 µM, mõlemat praimerit lõppkontsentratsioon 0,8 µM, umbes 20 ng märklaud-DNA-d ja 0,5 U *Taq* DNA polümeraasi (Fermentas).

Võimaliku DNA saastatuse vältimiseks kasutati iga PCR-i korral negatiivset kontrolli, mis koosnes kõigist PCR segu komponentidest, väljaarvatud märklau DNA.

PCR viidi läbi *Eppendorf Mastercycler* PCR masinas ning kasutati järgnevat programmi:

1. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 5 minutit. Järgnevad etapid kordusid 45 tsükli vältel: 2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 1 minut. 3. Praimerite seondumine DNA-ga 45 sekundit (seondumistemperatuurid erinevatele praimeritele on toodud Tabelis 1). 4. Uue DNA ahela süntees 72°C juures 0,5-1 minutit sõltuvalt produkti suurusest. Lõppekstensioon toimus 8 minuti jooksul 72°C juures. Negatiivse kontrolli puhtust, õige produkti olemasolu ja pikkust kontrolliti etiidumbromiidi sisaldaval 0,8% agarosgeelil UV valguse all. Tolueeniraja geenifragmentide olemasolu tuvastamiseks kasutati positiivse kontrollina järgmiste tüvede DNA-sid: *P. putida* mt-2 (*xylA*), *Ralstonia eutropha* JMP134 (TMO geen) ja *Burkholderia xenovorans* DSMZ17367 (TDO geen).

Tabel 1. PCR ja qRT-PCR programmides ning sekveneerimiseks kasutatud praimerid

Praimer	Järjestus (5'-3')*	Produkti pikkus (bp)	Praimerite seondumistemperatuur	Viide
TMO_F TMO_R	AAGACATCCTATCCGGARTAYGT AGAAACTGCATGTTGGTRAANCC	480	57°C	Käesolev töö
xylA_F xylA_R	CTSTATCARTCCGGMTATCG CATGCCMCGYTTYCCTTTCC	645	54°C	Käesolev töö
TOD_F TOD_R	AGTGGGTCATTCCSTGYAACTGG CCAGTTCTCGCCRTCTCYTGHTC	500	60°C	Käesolev töö
TMO_qF TMO_qR	CCAATGTCAAGCGGAGCAGG GTTTCGAATGCGAAGGTCAGC	200	58°C	Käesolev töö
xylA_qF xylA_qR	CCRYGATGGTCTGCGTAGC CATGCCMCGYTTYCCTTTCC	203	58°C	Jutkina <i>et al.</i> , 2013
rpoD_qFw rpoD_qRev	GCAACAGCAGTCTCGTATCA ATGATGTCTTCCACCTGTTCC	150	58°C	Tamman <i>et al.</i> , 2014
LmPH_2D67_qF LmPH_2D67_R	GATGCACGTTTCAGCAGGACC ACCTAAGGTCATGTGACGTGC	200	60°C	Käesolev töö
rpoB_qF rpoB_qR	CGTATGAACGTGGGTCAGATT CCACCAACCTTGTTATAAATCTTG	145	60°C	Käesolev töö (S.Viggor)

*Nukleotiidide tähistused: **M** - A või C; **R** - A või G; **Y** - C või T; **N** - A/C/T või G; **S** - C või G; **H** - A/C või T.

5.3. Sekveneerimine ja nukleotiidsete järjestuste analüüs

Amplifitseeritud PCR produktide sekveneerimiseks kasutati *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* komplekti (Applied Biosystems) vastavalt tootja protokollile. Selleks, et lõhkuda praimerid ja eemaldada nukleotiididelt 5' positsioonis kaks fosfaatjääki vältimaks nukleotiidide lülitumist sünteesitavasse DNA ahelasse tehti PCR produktidele ExoI-SAP ensümaatiline töötlus 37°C juures 15 minutit. Selleks lisati reaktsioonisegusse eksonukleaasi ExoI lõppkontsentratsioon 0,4 U/μl (Fermentas) ja aluselist fosfataasi (SAP- *Shrimp Acid Phosphatase*; Fermentas) lõppkontsentratsioon 0,4 U/μl, peale mida inaktiveeriti ensüümid 80°C juures 15 minuti jooksul. Seejärel valmistati proovid sekveneerimiseks ette vastavalt tootjapoolsetele soovitudele.

Sekveneerimisreaktsioon viidi läbi *Eppendorf Mastercycler* masinas järgnevatel tingimustel:

- 1) Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 95°C juures 15 sekundit.
- 2) Praimeri seondumine vastaval temperatuuril (Tabel 1) 15 sekundit.
- 3) DNA ahela pikendamine 60°C juures 45 sekundit.

Läbiviidavate kordustsüklite arv valiti sõltuvalt produkti pikkusest. Seejärel DNA sadestati, pesti ja võeti üles 70% formamiidis.

Proovid sekveneeriti *3730xl DNA Analyzer* sekvenaatoriga (Applied Biosystems). Saadud nukleotiidsete järjestuste analüüsimiseks kasutati programmi BioEdit versiooni 7.1.11 (Hall, 1999) ning võrreldi andmebaasides leiduvate järjestustega BLASTN programmi abil. Järjestuste joondamiseks kasutati programmi CLUSTALX versiooni 2.0.11 *neighbour-joining* meetodit. Fülogeneetiliste puude vaatamiseks kasutati programmi TreeView versiooni 0.5.0.

Käesoleva töö käigus GenBanka deponeeritud järjestuste numbrid on esitatud Tabelis 2.

6. Induktsioonikatsed tolueeniraja võtmeensüümide aktiivsuste määramiseks

Induktsioonikatsed viidi läbi 150-ml tihedalt suletavates Erlenmeyeri kolbides kas LB või R2A söötmes, kuhu oli lisatud indutseeriva süsinikuallikana kas fenooli (2,5 mM) või tolueeni (1,5 mM). Üleöö kasvatatud rakud külvati ümber induktorivaba ja induktoritega söötmetesse ning kasvatati optilise tiheduseni 1,0-1,5. Rakud fuugiti põhja ja pesti 2x külma 50 mM fosfaatpuhvriga, pH 7,5, 3000 x g juures (4°C). Seejärel rakud resuspendeeriti 100 mM fosfaatpuhvril (pH 7,5) ning lüüsi ultraheliga.

Purustamata rakud ja rakukestad eemaldati külmfuugimise (4°C) teel 11 000 x g juures 25 minuti jooksul. Saadud supernatanti kasutati rakuvaba ekstraktina (RVE) ensüümide aktiivsuste määramisel.

6.1. Bensüülalkoholi dehüdrogenaas

Bensüülalkoholi dehüdrogenaasi aktiivsus määrati spektrofotomeetriselt NAD-i redutseerumise järgi 340 nm juures ($\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Dinkla *et al.*, 2001 kohandatud meetodika põhjal. Reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml ning see koosnes 2 mM NAD-ist, 4 mM bensüülalkoholist ning RVE-st.

6.2. Katehhooli 2,3-dioksügenaas

Katehhooli 2,3-dioksügenaasi aktiivsus määrati spektrofotomeetriselt 2-hüdroksümukonosemialdehüüdi tekkimise järgi 375 nm juures ($\epsilon_{375 \text{ nm}} = 14,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) Feist ja Hegeman (1969) kohandatud meetodika põhjal. Reaktsioonisegu mahuks oli 2 ml ja see koosnes 0,3 mM katehhoolist, 100 mM fosfaatpuhvrist (pH 7,5) ja RVE-st, mis oli valmistatud samasse puhvrise.

Ensüümide eriaktiivsuste arvutamiseks määrati optilise tiheduse muutus minutis valgu hulga (mg ml^{-1}) kohta reaktsioonisegus. Valgu kontsentratsioonid määrati Bradfordi meetodil (Bradford, 1976).

6.3. RNA eraldamine

TMO, LmPH ja XylA geenide ekspressiooni uurimiseks eraldati RNA induktorivabas söötmes (R2A) kasvatatud ja fenooli ning toluleeniga indutseeritud kolme eraldiseisva kasvatusel rakkudest. Proove (0,5 ml) tsentrifuugiti 11 000 x g (4°C) juures 2 minutit ning seejärel külmutati rakulüsaadid vedelas lämmastikus ja säilitati kuni RNA eraldamiseni – 80°C juures. RNA eraldamiseks ja puhastamiseks kasutati Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA kitti vastavalt tootjapoolsele protokollile. DNA kontaminatsiooni vältimiseks viidi läbi kaks DNase I lisatöötlust vastavalt protokollile (Fermentas). RNA kvaliteeti hinnati elektroforeetiliselt 0,8% agarosgeelil. RNA puhtuse kontrolliks tehti tavaline PCR samade praimeritega, mida kasutati hiljem qPCR-i jaoks. Saadud RNA kogus mõõdeti spektrofotomeetril Nanodrop ND1000.

6.4. qRT-PCR

qRT-PCR-i jaoks kasutati QIAGEN Group masinat RotorGene® 2.0.2 ja Invitrogeni SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR kitti. Reaktsioonisegu mahuks oli 10 µl, mis sisaldas 10 ng RNA-d; 0,4 µl mõlemat praimerit (10 mM); 5 µl 2x SYBR®Green Rxn segu; 0,2 µl SSIII Platinum *Taq* segu ja Rnaasivaba vett. Kõiki proove amplifitseeriti kolmes korduses ja samadel tingimustel. Referentsgeenideks olid *rpoB* (LmPH) ja *rpoD* (XylA ja TMO). Võimaliku DNA saastatuse avastamiseks kasutati negatiivset kontrolli, mis koosnes kõigist qRT-PCR segu komponentidest, välja arvatud märklaud-RNA.

qRT-PCR viidi läbi järgneva programmi abil:

1. 50°C 3 min
2. 95°C 5 min
3. 40x tsüklitel: 95°C 15 s; 62°C 30 s; 72°C 20 s
4. 40°C 1 min
5. Sulamiskõver 72-95°C, 1 kraadi kaupa, masin ootas 4 s enne järgmist etappi.

Kõikide proovide qRT-PCR tulemusi analüüsiti, võttes arvesse RotorGene® Q (versioon 2.0.2) programmi poolt väljendatud sulamiskõverate asukohti ja kuju, geenifragmentide paljundamise efektiivsust ning paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtlust. Lisaks kasutati iga proovi individuaalse amplifikatsiooni efektiivsuse hindamiseks programmi LinRegPCR versiooni 11.1 (Ruijter *et al.*, 2009). Tüvede ja tingimuste vaheliste varieeruvuste leidmiseks kasutati F-testi ning statistiliste erinevuste leidmiseks T-testi. Keskväärtustele arvutati 95% usalduspiirid.

TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleval uurimistööl oli kolm peamist eesmärki:

1. Tuvastada Läänemere veest isoleeritud bakterite kollekttsioonist tolueenilagundajad tüved ja iseloomustada neid tüvesid fenotüübiliste ja geneetiliste tunnuste põhjal.
2. Teha kindlaks tolueeni lagundamisel osalevaid monooksügenaase kodeerivad geenid, uurida nende fülogeneetilist mitmekesisust ning võrrelda seda fenooli hüdroksülaasi ja katehhooli 2,3-dioksügenaasi geenide fülogeneetilise klasterdumisega.
3. Määrata redundantsete katalüütiliste funktsioonidega tüvedel tolueeni erinevate lagundamisradade võtmeensüümide aktiivsus ja redundantsete geenide mRNA ekspressioonitase.

TULEMUSED

7. Tolueenilagundajate bakterite fenotüüpiliste tunnuste üldiseloostus

Tabelis 2 on toodud 44 tolueeni kui ainsat süsiniku- ja energiaallikat kasutavat bakteritüve, keda antud töö käigus iseloomustati nende kasvusubstraadide, bakteriaalsete multikomponentsete monooksügenaaside geenide ning plasmiidide esinemise põhjal. Lisaks alustati meie töörühmas täieliku genoomse nukleotiidijärjestuse määramist 11 uuritud tüvel (Tabel 2, tüve kood esitatud rasvases trüki).

Tolueeni kasutajateks osutusid kolme bakteriperekonna - *Pseudomonas* (33 tüve), *Acinetobacter* (10 tüve) ja *Sphingomonas* (1 tüvi) esindajad. *Pseudomonas* perekonnast oli enim esindatud liik *P. stutzeri* (29 tüve). Selgus, et paljud tolueenilagundajad kasutasid kasvusubstraadina ka fenooli. Neid tüvesid oli meie uurimisgrupp juba varasemas publikatsioonis (Tabel 2, Vedler *et al.*, 2013) üksikomaduste osas (liigiline määratlus, fenooli lagundamise võtmeensüümid, plasmiidide esinemine) iseloomustanud. Samuti omasid osad käesolevas töös uuritud tüved plasmiidset DNA-d, mida oli samuti kajastatud meie töögrupi varasemas artiklis (Jutkina *et al.*, 2011). Eelnevalt saadud andmete kasutamine oli vajalik antud töös püstitatud eesmärkide täitmiseks. LmPH geeni esinemist õnnestus tõestada 30 juhul, millest kahe tüve puhul (*Sphingomonas xenophaga* 2D23 ja *P. stutzeri* 2D54) kasv fenoolil puudus. Seevastu kuus tüve (2D61, 2Aph5, 2C8, 2D47, 2C56 ja 2Cphe2) olid küll võimelised fenoolil kasvama, kuid käesolevas töös kasutatud praimeritega ei õnnestunud LmPH geeni esinemist näidata.

Kõiki Tabelis 2 toodud tüvesid, va. perekonna *Acinetobacter* esindajaid, iseloomustas C23O esinemine. Seda näidati nii ensümaatilise aktiivsuse olemasolu kui ka *xylE* praimeritega PCR produktide moodustamise alusel. Erilist tähelepanu väärib fakt, et tolueenilagundajate hulka kuulusid ka mitme C23O geeniga tüved. Varasemalt on töögrupi poolt tuvastatud tüvedes 2A38 ja C52 vastavalt 2 ja 3 erinevat C23O geeni (Vedler *et al.*, 2013). Antud töös selgus, et *Sphingomonas xenophaga* tüve 2D23 C23O on kodeeritud kolme erineva järjestusega geeni poolt (Joonis 6B).

Tolueeni lagundamisel osalevatest geenidest testiti käesolevas töös TDO, *xylA* ja TMO-geene. Kasutatud praimerid on ära toodud Materjali ja meetoodika osas (Tabel 1). Selgus, et uuritud tüvedel puudus tolueeni dioksügenaasne rada (Tod). TOL plasmiididele iseloomulik

Xyl-rajaja esimene geen *xylA* esines 20 tüvel. Nagu eeldatigi, kasvasid antud tüved *m*-toluaadil ning üheteistkümmel neist esines plasmiidne DNA. Selle esinemine tuvastati veel ka kuuel perekonna *Acinetobacter* esindajal. TMO-sid kodeerivad geenid esinesid seitsmeteistkümmel tüvel. Näidati, et perekonna *Acinetobacter* liigid lagundavad hästi tolueeni, fenooli ja metüleeritud fenooli, kuid vähem just *m*-toluaati. Selle perekonna esindajate puhul ei õnnestunud leida ühtegi tolueeni oksüdeerimise eest vastutavat geeni. Sellegipoolest kasutasid nad kasvusubstraatidena Tmo operoni poolt kodeeritava raja vaheprodukte (*p*-hüdrosübensoaat ja protokatehhuaat). Tolueeni lagundamisraja võtmeensüüme ei leitud ka *P. stutzeri* tüvedel 2C23, 2D37 ja 2D54, küll aga omasid nad LmPH geeni. Eraldi rühma moodustasid tüved, kellest leiti nii metüülrühma oksüdeeriv Xyl-rada, kui ka aromaatsset tuuma oksüdeerivat TMO-d kodeerivad geenid. Need redundantsete katalüütiliste funktsioonidega (RKF) tüved (2Aphe4, 2A20, 2C41, 2Anah4, 2C63 ja 2B45) olid kitsa substraadi- ja tugeva regioonispetsiifilisusega - lagundasid kresoolidest eelistatult just *p*-kresooli. Fenooli ja tolueeni katabolismi eest vastutavad ensüümid ei olnud nimetatud tüvedes plasmiidiselt kodeeritud, samal ajal kui tüüpilise Xyl-rajaga ning fenooli mittelagundavad tüved kandsid enamasti suurt kataboolset plasmidi (Tabel 2).

Erinevate TMO-de esinemist uuritud liikidel saab kindlaks teha vastavate lagundamisradade esmastel vaheproduktidel ehk kresoolidel kasvu põhjal. Tabelist 1 on näha, et TMO positiivsed tüved rühmitusid erinevalt substraadispetsiifilisuse ja kasvusubstraatide regioonispetsiifilisuse põhjal. Tüved 2C30, 2A50, 2Aphe2, 2C47, 2Ato13 ja 2C28 olid suhteliselt laia substraadi- ning nõrga regioonispetsiifilisusega.

Tabel 2. Tolueenilagundajate bakterite iseloomustus kasvusubstraatide, multikomponentsete monooksügenaaside ja plasmiidide esinemise põhjal

Tüve kood ^a	Määratud liik ^b	Kasvusubstraadid ^c								BMM-ide geenid	Järjestuste numbrid geenipangas				
		Tln	mTol	Phe	pCre	oCre	mCre	PHB	PCA		Plasmiid	LmPH	C23O	xylA	tmoA
2D61	<i>Pseudomonas putida</i>	++	+++	++	++	++	+	+++	+++	xylA	+	-	JX177778	KC255406	-
2B49	<i>P. anguilliseptica</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	xylA	+	-	JX177781	KC255405	-
2Aphe5	<i>P. stutzeri</i> *	+	+++	+	+	+	+	+++	-	xylA	-	-	JX177779	KJ679472	-
2A54	<i>P. stutzeri</i>	+	+++	-	-	+	-	+	-	xylA	+	-	JX177768	KC255410	-
2D49	<i>P. stutzeri</i>	++	+++	-	-	-	-	+	-	xylA	+	-	JX177765	KC255409	-
B10v	<i>P. stutzeri</i> *	+	+++	+	-	-	-	+	-	LmPH;xylA	-	JX177830	JX177773	KC255408	-
2D66	<i>P. stutzeri</i> *	++	+++	+	-	-	-	+	+	xylA	+	-	-	KJ679466	-
2Atol1	<i>P. stutzeri</i> *	++	+++	-	+	+	+	+	-	xylA	-	-	JX177775	KJ679467	-
2C8	<i>P. stutzeri</i> *	++	+++	+	++	++	+	++	-	xylA	-	-	JX177767	KJ679470	-
D67	<i>P. migulae</i>	+	++	-	+	+	+	+	+	xylA	+	-	JX891461 (Tn)	JX891461 (Tn)	-
D2RT	<i>P. migulae</i>	+	++	-	-	-	-	+	-	xylA	+	-	JX891462 (PI)	JX891462 (PI)	-
2D47	<i>P. stutzeri</i>	+	+++	-	+	-	+	+	+	xylA	+	-	JX177766	KC255412	-
2D23	<i>Sphingomonas xenophaga</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	LmPH;xylA	+	-	-	KJ679473	-
2C23	<i>P. stutzeri</i> *	++	-	++	+	+	+	-	-	LmPH	-	JX177809	JX177742	-	-
2D37	<i>P. stutzeri</i> *	++	-	++	+++	+	+	++	-	LmPH	-	JX177810	JX177743	-	-
2D54	<i>P. stutzeri</i> *	++	-	+	+++	++	+	+	-	LmPH	-	JX177807	JX177744	-	-
C52	<i>P. stutzeri</i> *	++	++	++	++	++	+	+	+	LmPH;xylA	-	JX177806	JX177739	KJ679474	-
2C30	<i>P. stutzeri</i> *	+++	++	++	+++	++	++	+++	-	LmPH;TMO	-	JX177795	JX177764	-	KJ679447
2A50	<i>P. stutzeri</i> *	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	LmPH;TMO	-	JX177794	JX177763	-	KJ679448
2Aphe2	<i>P. stutzeri</i> *	+++	++	+++	+++	++	++	+++	-	LmPH;TMO	-	JX177800	JX177759	-	KJ679449
2C47	<i>P. stutzeri</i> *	+++	++	+	+++	++	++	+++	-	LmPH;TMO	-	JX177791	JX177756	-	KJ679450
2Atol3	<i>P. stutzeri</i> *	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	LmPH;TMO	-	JX177801	JX177760	-	KJ679451
2C28	<i>P. stutzeri</i>	+	++	++	++	+++	++	+++	-	LmPH;TMO	ND	JX177793	JX177755	-	KJ679452
2A33	<i>P. stutzeri</i>	+++	+	+	++	+	+	+	-	LmPH;TMO	ND	JX177813	JX177753	-	KJ679453
2Cben1	<i>P. stutzeri</i> *	++	+	+++	++	+	++	+	-	LmPH;TMO	-	JX177815	JX177750	-	KJ679454
2A7	<i>P. stutzeri</i>	++	-	+++	++	+	+	+	-	LmPH;TMO	+	JX177811	JX177749	-	KJ679455
2Aben1	<i>P. stutzeri</i> *	+	+	+	++	++	+	+	-	LmPH;TMO	-	JX177803	JX177747	-	KJ679456
2A38	<i>P. stutzeri</i> *	+	++	++	++	++	++	++	-	LmPH;TMO	-	JX177805	JX177740;JX177741	-	KJ679457
2Aphe4	<i>P. stutzeri</i>	+	-	+++	+	+	+	+	-	LmPH;xylA;TMO	+	JX177812	JX177752	KJ679471	KJ679458
2A20	<i>P. stutzeri</i> *	++	++	++	++	+	++	++	++	LmPH;xylA;TMO	-	JX177825	JX177769	KC255407	KJ679459
2C41	<i>P. stutzeri</i> *	++	++	++	++	-	-	++	-	LmPH;xylA;TMO	-	JX177824	JX177771	KJ679464	KJ679460
2Anah4	<i>P. stutzeri</i> *	+	+++	++	++	+	+	++	-	LmPH;xylA;TMO	-	JX177826	JX177772	KJ679465	KJ679461
2C63	<i>P. stutzeri</i> *	++	+++	++	++	+	+	++	+	LmPH;xylA;TMO	-	JX177823	JX177770	KJ679468	KJ679462
2B45	<i>P. stutzeri</i> *	+	++	+	+	-	-	-	-	LmPH;xylA;TMO	-	JX177827	JX177774	KJ679469	KJ679463
2D67	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	++	+	+	+	+	+	+++	-	LmPH	+	-	-	-	-
D65v	<i>Ac. schindleri</i>	++	+	-	+	+	+++	+++	+	-	+	-	-	-	-
2C56	<i>Ac. johnsonii</i>	++	+	-	+	+	++	+++	++	-	+	-	-	-	-
2Cphe2	<i>Ac. johnsonii</i>	++	+	-	+	+	+	+++	+	-	+	-	-	-	-
A52	<i>Ac. haemolyticus</i>	++	+	+++	++	+	+	+++	+	LmPH	+	-	-	-	-
D14	<i>Acinetobacter</i> sp.	+	+	++	-	+	-	+++	++	LmPH	+	JX177836	-	-	-
D36	<i>Ac. lwoffii</i> *	+	+	+	+	+	+	+	-	LmPH	-	JX177839	-	-	-
A22	<i>Ac. haemolyticus</i> *	++	+	+++	++	+	++	+++	+++	LmPH	-	JX177835	-	-	-
D52	<i>Ac. johnsonii</i> *	+	+	+++	+	++	+	+++	++	LmPH	-	JX177840	-	-	-
D66v	<i>Ac. johnsonii</i>	++	+	+	+	++	++	++	+	LmPH	ND	JX177841	-	-	-

^a tugevas kirjas koodi nimi - WGS projektis olevad tüved; ^b tärn tähistab tolueenilagundajates tüvedes plasmiidse DNA testimist käesolevas töös, tärnita tüved olid testitud varem (Jutkina *et al.*, 2011); ND - ei määratud (*Not detected*); ^c 48 h vaatlus, kus +, ++, +++ näitavad külvijoone erinevat tugevust ja -kasvu puudumist 1,0 mM tolueenil (Tln); 2,5 mM *m*-toluaadil (*m*Tol), fenoolil (Phe); 1,3 mM *p*-, *o*- ja *m*-kresoolil (*p*Cre, *o*Cre, *m*Cre), *p*-hüdrosübensoaadil (PHB) ja protokatehhuaadil (PCA); kõik tüved, va perek. *Acinetobacter* olid C23O positiivsed.

8. BMM-ide fülogeneetiline analüüs

8.1. Tolueeni monooksügenaasid (TMO-d)

Kuigi käesolevas töös analüüsitud TMO-de järjestuste erinevused olid väikesed, oli siiski võimalik neid fülogeneetiliselt ja substraadispektri järgi rühmitada kolme klastrisse. Kõik seitseteist TMO geeni omavat tüve olid ka fenoolikasutajad ja neis detekteeriti LmPH geen. Jooniselt 5A on näha, et kolmest TMO-de klastrist kaks (I ja II) olid unikaalsed ja väga lähedased ning eristusid selgelt kõigist senikirjeldatud TMO-de järjestustest. Klaster I sisaldas 5 identse TMO järjestusega tüve (2A33, 2A38, 2Cben1, 2A7, 2Aphe4) ning üht lähedase järjestusega tüve 2Aben1. Klaster II sisaldas 6 identse TMO järjestusega tüve (2Aphe2, 2C30, 2A50, 2C47, 2Ato13, 2C28), nende ensüümide ühtlane lai substraadispetiifilisus viitab ilmselt ka ühtsele päritolule. Klaster III koosnes viiest RKF bakteritüve (2C41, 2C63, 2Anah4, 2B45, 2A20) TMO-st, mis olid identsed *P. stutzeri* OX1 tüve TMO-ga. Erandiks oli tüve 2Aphe4 TMO rühmitumine klastrisse I erinevalt teistest RKF tüvede TMO-dest.

Joonisel 5B on toodud uuritud tüvede LmPH-de fülogeneesipuu. Dendrogrammil eristusid neli LmPH klastrit, millest I (2A38, C52, 2D37, 2D54, 2C23) kuulus ka *Pseudomonas* sp. CF600 Dmp operoni poolt kodeeritud PH. Lisaks klasterdusid siia ka nende tüvede (2Cben1, 2A33, 2A7, 2Aphe4) PH-d, mille TMO-d kuulusid I klastrisse (Joonis 5A). Neljandasse klastrisse kuuluvate tüvede PH-d olid *Pseudomonas fluorescens* PC18-ga lähedas suguluses ja omasid laia substraadispetiifilisusega TMO-sid (klaster II). Kolmandasse klastrisse paigutusid 5 RKF tüve (2A20, 2Anah4, 2B45, 2C63, 2C41) PH-d, mis viitab TMO-de ja PH-de koossevoluteerumisele. Teise klastrisse paigutusid perekonnast *Acinetobacter* pärinevad LmPH-d ja neid iseloomustas sugulus multikomponentsete PH-dega (MphN ja MopN), mis pärinevad tüvedest, kus fenooli lagundamine toimub üle *ortho*-raja, st. C12O osalusel. Huvitaval kombel kuulus samasse klastrisse ka LmPH *Sphingomonas xenophaga* tüvest 2D23, kus aromaatsse rõnga lõhustamisel osaleb hoopis C23O. Tegemist on multiplasmiidse tüvega, kelle täisgenoomi sekveneerimisel leiti 3 erineva järjestusega C23O geeni.

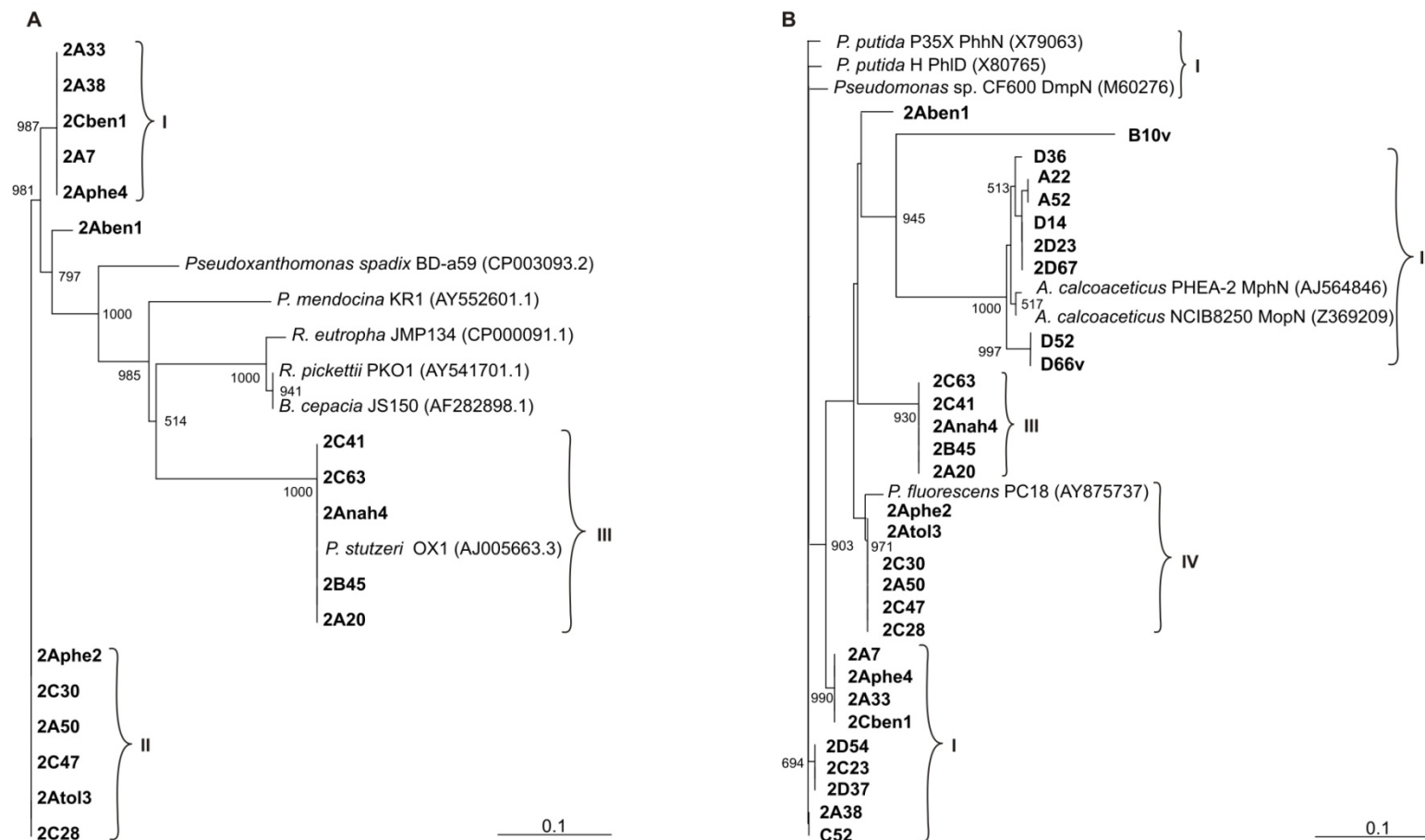
8.2. Ksüleeni/tolueeni monooksügenaasid (XylA-d)

Uuritud 20 bakteritüve XylA järjestused klasterdusid kolme klastrisse, millest enim eristus klaster II, kuhu kuulusid ka kahe *P. migulae* tüve, D67 ja D2RT, ning *P. stutzeri* 2D47 XylA-d (Joonis 6A). Kaks esimest tüve olid juba varem uuritud TOL plasmiidide kandjad. Kui I (va. 2Aphe5) ja II klastrisse kuuluvate tüvede XylA-d olid (ilmselt) plasmiidseti kodeeritud,

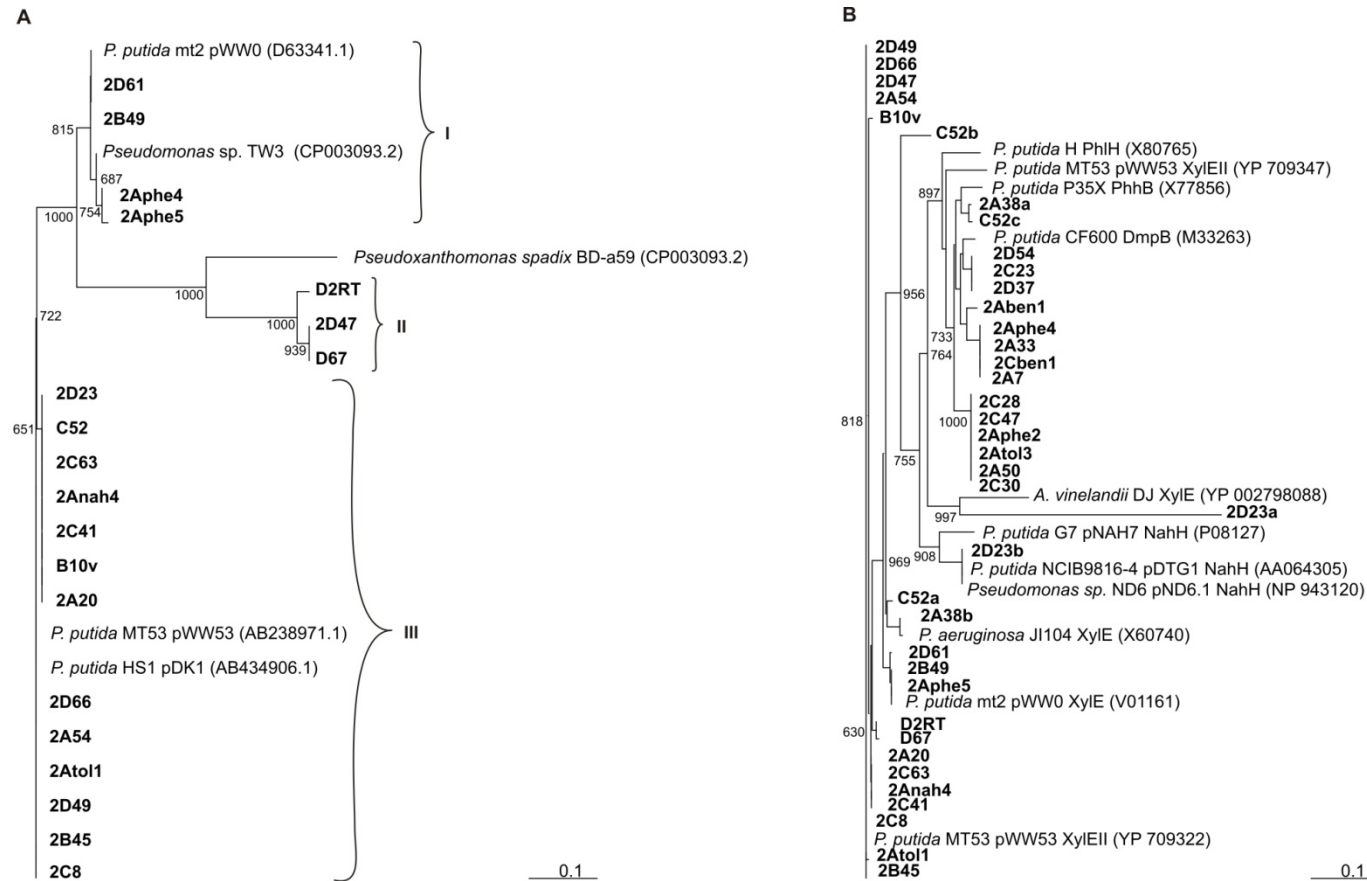
siis III klastris oli 13 tüvest vaid 4 (2D23; 2D66; 2D49; 2A54) autonoomse plasmiidse DNA-ga. See klaster moodustus kahest identsete XylA järjestustega grupist, kus ühes asetsesid eespool nimetatud viie RKF tüve ning tüvede B10v ja 2D23 XylA-d. Kõiki neid tüvesid iseloomustas ka LmPH esinemine. Kogu klaster III oli väga lähedane XylA-ga TOL plasmiidist pWW53 tüvest *P. putida* MT53. Niisiis ei eristunud antud fülogeneetilisel puul oluliselt need XylA-d, mis pärinesid RKF tüvedest (2A20, 2Anah4, 2B45, 2C63, 2C41).

Eeldati, et *xylA* kui Xyl-raja ülemise operoni esimene geen võiks fülogeneetilisel analüüsil klasterduda sarnaselt kataboolse ahela alumise operoni *xylE* järjestustega, mis kodeerib C23O-d. Üldjuhul see nii ka oli, sest TOL plasmidi pWW0-tüüpi XylA-d (tüvedel 2D61, 2B49 ja 2Aphe5) klasterdusid sama moodi kui kõnealuste tüvede C23O-d vastaval fülogeneetilisel puul ning 12 TOL plasmidi pWW53-tüüpi XylA-d klasterdusid samal kombel kui nende tüvede C23O-d (Joonis 6B). Ülejäänud tüvede C23O-d klasterdusid erineva lähedusastmega fenooli lagundamist määrava tüve CF600 DmpB-ga. Nende hulka kuulus ka RKF tüve 2Aphe4 C23O, kusjuures selle tüve XylA klasterdus kokku TOL plasmidi pWW0 poolt kodeeritud XylA-ga. Mitme C23O geeniga tüved olid veelgi heterogeensemad. Näiteks oli tüvede C52 ja 2A38 üks C23O geenidest lähedane XylE-ga *P. aeruginosa* tüvest JI104, teine aga kaugelasetseva PhhB-ga *P. putida* tüvest P35X. Tüve C52 kolmas C23O geen klasterdus samuti selgelt eraldi sama tüve teistest C23O-dest. Multiplasmiidse tüve 2D23 üks C23O oli väga sarnane NAH plasmiidide NahH-ga, samal ajal kui teise ja kolmanda järjestused olid väga kauged teistest antud analüüsis uuritud järjestustest (ühte neist polnud võimalik isegi teostatud fülogeneetilisel analüüsil kasutada, kuna see oli niivõrd kauge järjestusega).

Järelikult, ehkki meie poolt uuritud XylA-de mitmekesisus korreleerus hästi TOL kataboolsetes plasmiidides kodeeritud XylE-de mitmekesisusega, esines plasmiididel RKF tüvel 2Aphe4 ning mitme erineva C23O-ga tüvedel oluline kataboolsete geenide heterogeensus, mis viitab plasmiidsete operonide kataboolsete moodulite kombinatoorika võimalustele vastusena erinevates keskkonntingimustes esinevale selektiivsele survele.



Joonis 5. Lähimsideme meetodil konstrueeritud juurimata dendrogrammid, millel on toodud: (A) tolueeni monooksügenaaside (TMO; 138 aminohapet) ja (B) multikomponentse fenooli hüdroksülaasi suure subühiku (LmPH; 179 aminohapet) valgujärjestusi iseloomustavad fülogeneetilised võrdluspuid. Fülogeneetiliste puude hargnemispunktides on näidatud *bootstrap* analüüsi väärtused (1000 replikaati) alates 50%-st. Mõõtskaala pikkus on võrdne 0,1 asendusega aminohappe kohta. Referentstüvede valgujärjestused geenipangast (*GenBank*): *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 (CP003093.2), *Pseudomonas mendocina* KR1 (AY552601.1), *Ralstonia eutropha* JMP134 (CP000091.1), *R. pickettii* PKO1 (AY541701.1), *Burkholderia cepacia* JS150 (AF282898.1), *P. stutzeri* JS150 (AF282898.1), *P. putida* P35X PhhN (X79063), *P. putida* H PhID (X80765), *Pseudomonas* sp. CF600 DmpN (M60276), *P. fluorescens* PC18 (AY875737), *Azotobacter calcoaceticus* PHEA-2 MphN (AJ564846), *A. calcoaceticus* MopN (Z369209).

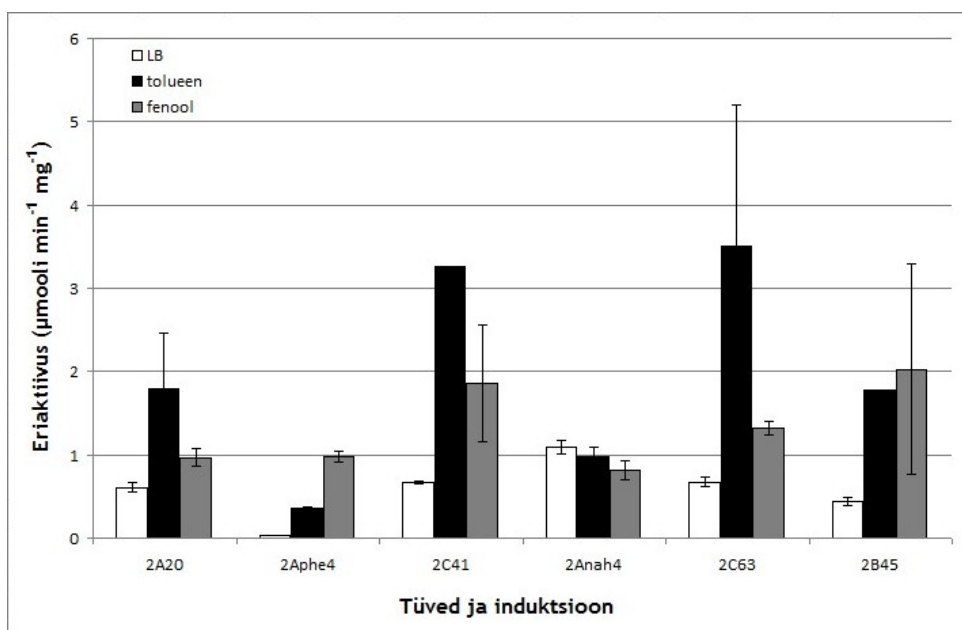


Joonis 6. Lähimsideme meetodil konstrueeritud juurimata dendrogrammid, millel on toodud: (A) ksüleenii monooksügenaaside (XylA; 199 aminohapet) ja (B) katehhooli 2,3-dioksügenaaside (C23O; 261 aminohapet) valgujärjestusi iseloomustavad fülogeneetilised võrdluspuud. Fülogeneetiliste puude hargnemispunktides on näidatud *bootstrap* analüüsi väärtused (1000 replikaati) alates 50%-st. Mõõtskaala pikkus on võrdne 0,1 asendusega aminohappe kohta. Referentstüvede valgujärjestused geenipangast (*GenBank*): *Pseudomonas putida* mt2 pWW0 (D63341.1), *Pseudomonas* sp. TW3 (CP003093.2), *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 (CP003093.2), *P. putida* MT53 pWW53 (AB238971.1), *P. putida* HS1 pDK1 (AB434906.1), *P. putida* H PhIH (X80765), *P. putida* MT53 pWW53 XylEII (YP 709347), *P. putida* P35X PhhB (X77856), *P. putida* CF600 DmpB (M33263), *Azotobacter vinelandii* DJ XylE (YP 002798088), *P. putida* G7 pNAH7 NahH (P08127), *P. putida* NCIB9816-4 pDTG1 NahH (AA064305), *Pseudomonas* sp. ND6 pND6.1 NahH (NP 943120), *P. aeruginosa* JI104 XylE (X60740), *P. putida* mt2 pWW0 XylE (V01161), *P. putida* MT53 pWW0 XylEI (YP 709322).

9. Katalüütiliste funktsioonide redundantsuse uurimine

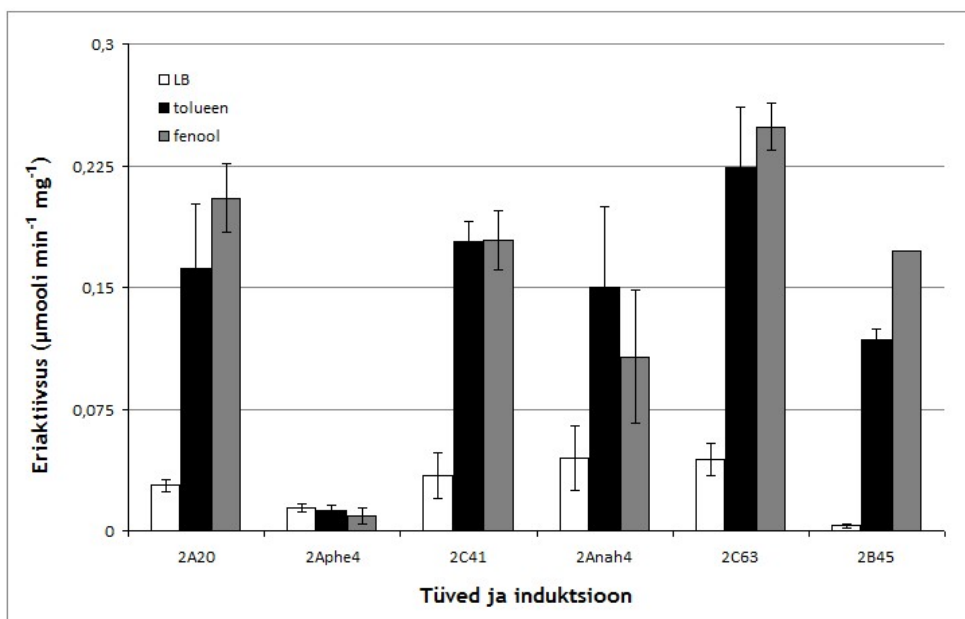
9.1. Ensümaatiline aktiivsus

Selleks, et teha kindlaks RKF tüvede ensüümide funktsionaalsust erinevate aromaatsete ühendite lagundamisel, määrati vastavad ensümaatilised aktiivsused nii RKF tüvedes (Xyl ja TMO) kui ka ühe tolueeni lagundamisrajaga (Xyl või TMO) tüüptüvedes. Selleks tehti kindlaks Xyl-raja teise ensüümi BADH ja C23O aktiivsused induktioonkasvatuste rakkudes, kusjuures induktoritena kasutati nii tolueeni kui ka fenooli. Viimane valiti võrdluseks, kuna see on lähedane TMO-de substraatidega.



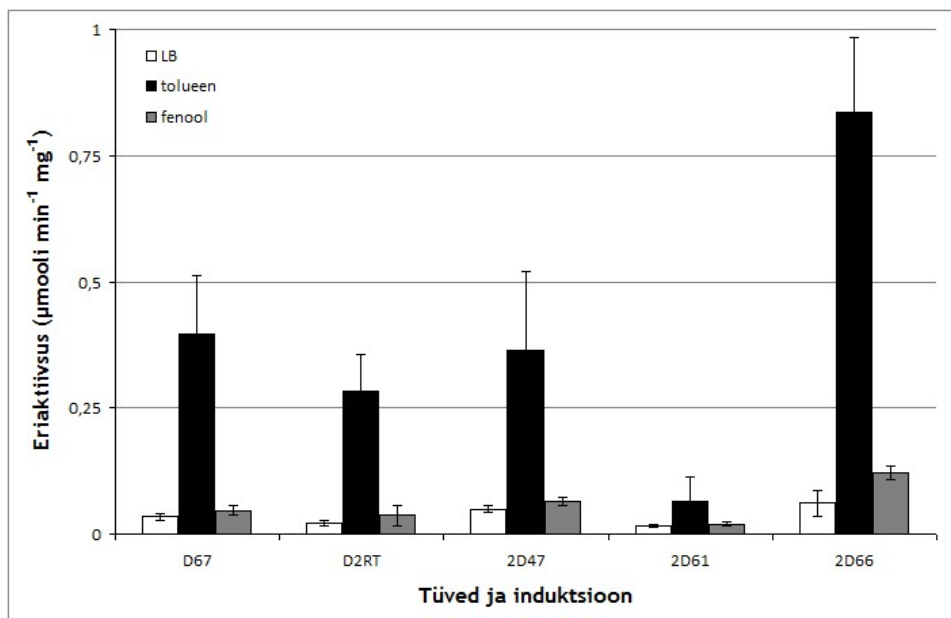
Joonis 7. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi eriaktiivsused ($\mu\text{mooli min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) RKF tüvedes. Joonisel on toodud standardhälbed, mis on saadud kolme eraldiseisva kasvatuses andmete alusel.

Kahte erinevat (metüülrühma või aromaatsset rõngast oksüdeerivat), kuid sama funktsiooniga ensüümi omavate tüvede puhul näidati C23O induktiooni nii fenooli kui ka tolueeniga (Joonis 7). Tegemist oli fenoolil kasvavate ning PH geeni omavate tüvedega, mis näitab fenooli lagundamisraja toimimist üle C23O.

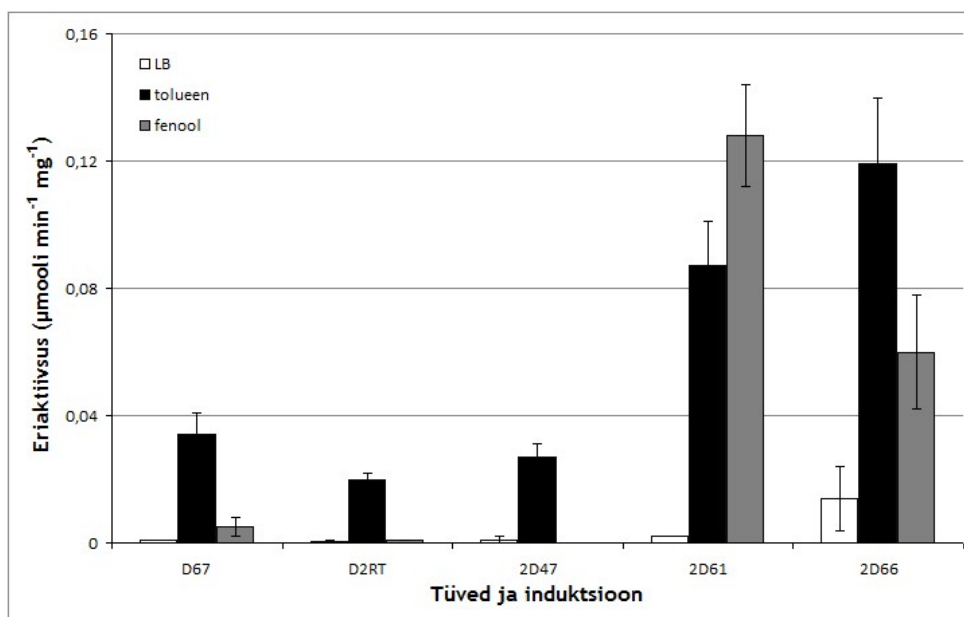


Joonis 8. Bensüülalkoholi dehüdrogenaasi eriaktiivsused ($\mu\text{mooli min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) RKF tüvedes. Joonisel on toodud standardhälbed, mis on saadud kolme eraldiseisva kasvatuses andmete alusel.

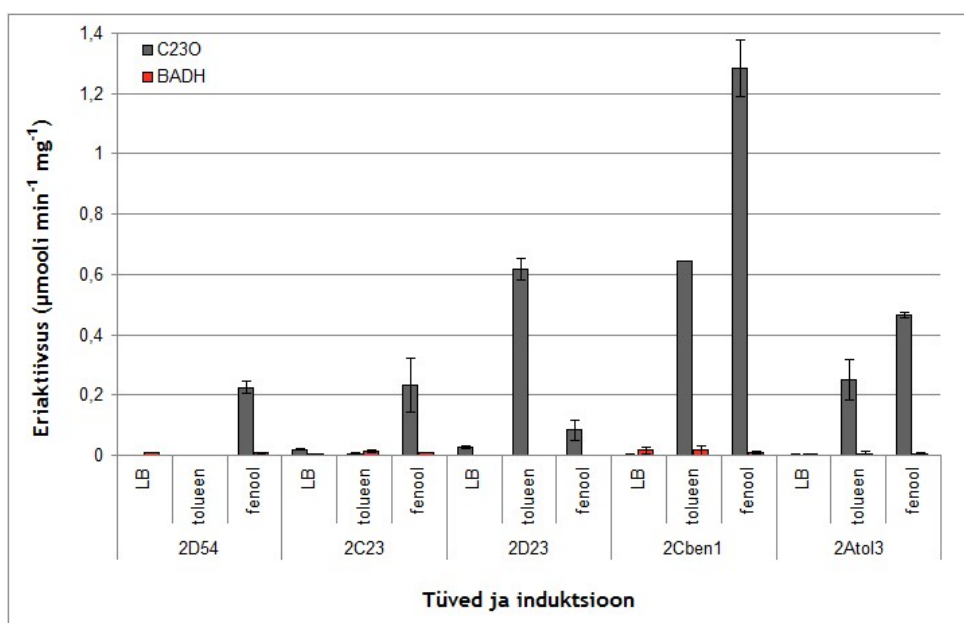
Xyl-raja võtmeensüümi BADH aktiivsused olid nii fenooli kui ka tolueni poolt peaaegu sarnaselt üles indutseeritud (Joonis 8). Induktsioon puudus aga tüve 2Ape4 puhul, mis näitab *xylB* mittefunktsionaalsust selles tüves.



Joonis 9. Katehooli 2,3-dioksügenaasi eriaktiivsused ($\mu\text{mooli min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) *xylA* positiivsetes tüvedes. Joonisel on toodud standardhälbed, mis on saadud kolme eraldiseisva kasvatuses andmete alusel.



Joonis 10. Bensüülalkoholi dehüdrognaasi eriaktiivsused ($\mu\text{mooli min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) *xylA* positiivsetes tüvedes. Joonisel on toodud standardhälbed, mis on saadud kolme eraldiseisva kasvatusandmete alusel.



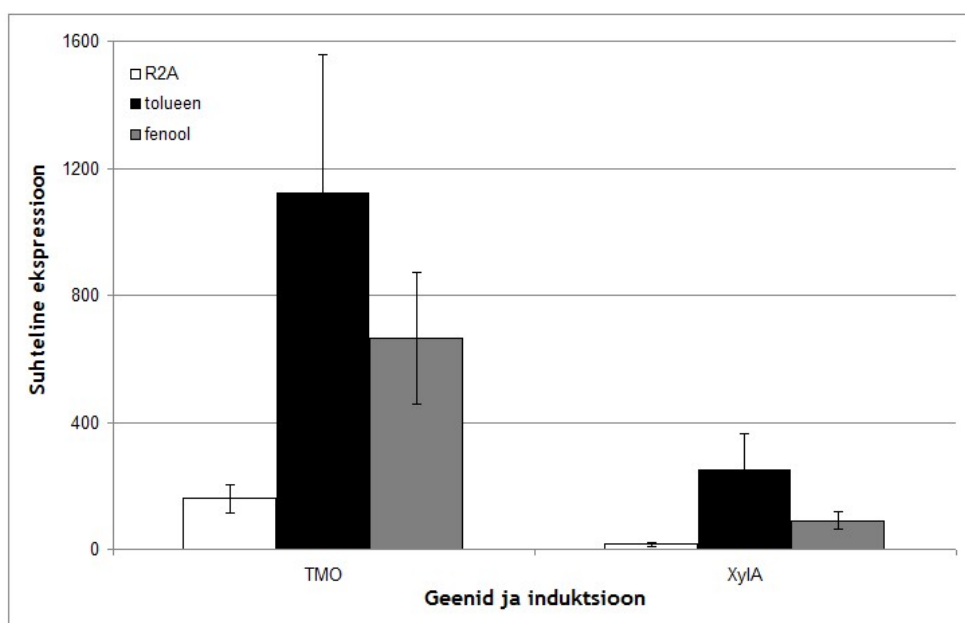
Joonis 11. Katehhooli 2,3-dioksügenaasi ja bensüülalkoholi dehüdrognaasi eriaktiivsused ($\mu\text{mooli min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) TMO negatiivsetes (2D54, 2C23, 2D23) ja positiivsetes (2Cben1, 2Ato13) tüvedes. Joonisel on toodud standardhälbed, mis on saadud kolme eraldiseisva kasvatusandmete alusel.

Ainult *XylA*-d omavates tüüptüvedes olid C23O-d ja BADH-d toluene poolt indutseeritud (Joonised 9, 10). Tegemist oli fenoolil mitte- või nõrgalt kasvavate tüvedega. Erinev oli tüvi 2D61, kes lagundas edukalt fenooli, kuid kelle C23O aktiivsus oli madal ning fenool oli

samas heaks induktoriks BADH-le (Joonis 10). Tüvi 2D66 ei olnud võimeline fenoolil kasvama, kuid BADH ekspresseerus ikkagi. Tegemist võis olla selle tüve BADH laia substraadispetsiifikaga. Siit nähtub, et fenool käitus Xyl-raja induktorina peamiselt neil juhtudel, kus tüvi oli võimeline ka fenoolil kasvama. TMO negatiivsetes, kuid fenoolil kasvavates tüvedes (2C23) oli C23O aktiivsus indutseeritud vaid fenooli poolt, TMO positiivsetes aga mõlema induktori poolt (Joonis 11). Huvitav oli siin 3 erineva C23O geeniga tüvi 2D23, kust ei tuvastatud küll ühtki TMO-d kodeerivat geeni, kuid tolupeen käitus C23O-le induktorina.

9.2. XylA ja TMO geenide ekspressioon mRNA tasemete põhjal

Kahe sama funktsiooniga tolupeedi lagundamisel osaleva geeni olemasolu sama bakteri rakkudes oli põhjuseks nende mõlema geeni funktsionaalsuse uurimiseks. *P. stutzeri* tüvi 2A20 valiti välja kui tüüpiline nimetatud omadusega bakterite hulgast. Seda, et Xyl-rada töötab neis RKF tüvedes, näitasid juba BADH ensümaatilised aktiivsused (Joonis 8).



Joonis 12. Tüve 2A20 *xylA* ja TMO geenide ekspressioonitasemete võrdlus induktorivabas (R2A), tolupeeniga või fenooliga indutseeritud log-faasi keskele kasvanud rakkudest. Joonisel on toodud 95% usalduspiirid.

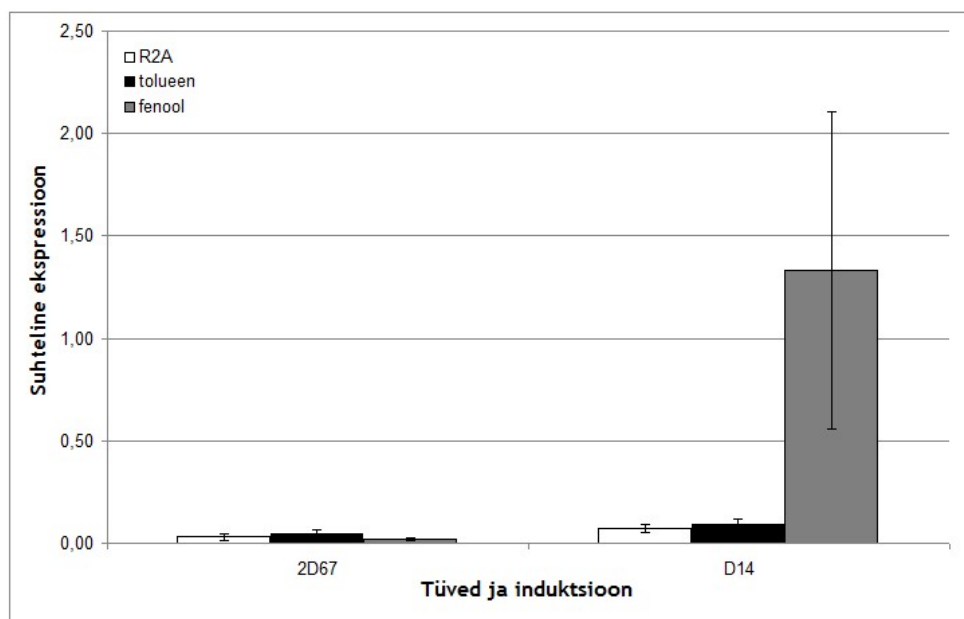
qRT-PCR meetodil määrati *xylA* ja TMO geenide mRNA tasemed nii induktorivabast keskkonnast (R2A) kui ka fenooli ja tolupeeniga indutseeritud logaritmilise kasvufaasi keskosa rakkudest. Jooniselt 12 on näha, et tüve 2A20 puhul oli TMO geeni ekspressioon tolupeenil 7,01 korda kõrgem ($p < 0,001$) ja fenoolil 4,14 korda kõrgem ($p < 0,001$) kui R2A-l. *xylA* puhul

saadi aga 16,39 korda kõrgem ekspressioon tolueenil ($p < 0,001$) ja 5,93 korda kõrgem *xylA* ekspressioon fenoolil ($p < 0,001$) kui R2A-l.

Saadud katsetulemused näitasid mõlema redundantse geeni funktsioneerimist RKF rakkudes. Fenooli mõju uuritud geenide ekspressioonile oli jälgitav ka qRT-PCR analüüsil, kust selgus fenooli kui induktori toime nii Xyl- kui ka TMO-raja ekspressioonile. Samas, fenoolil kasutavate tüvede korral, võisid peale fenooli induktorina käituda ka selle lagundamisel tekkivad vaheühendid nagu katehhool või viimase laguprodukt semialdehüüd.

10. Perekond *Acinetobacter* ja tolueeni lagundamine

Tabelis 2 toodud andmete põhjal sai perekond *Acinetobacter* hästi hakkama nii tolueeni kui metüleeritud fenoolide lagundamisega. Enamikest leiti PH-d, kuid mitte ühtegi tolueeni lagundamisrajas osalevat geeni. Tegemist oli bakteritega, kes reeglina omavad vaid katehhooli lagundamise *ortho*-rada, mis toodab metüülrühmadega substraatidest mittemetaboliseeritavaid vaheprodukte.



Joonis 13. Tüvede 2D67 ja D14 LmPH geeni ekspressioon. qRT-PCR analüüsiks ekstraheeriti RNA R2A-l ning fenooli ja tolueeniga indutseeritud log-faasi keskele kasvanud rakkudest. Joonisel on toodud 95% usalduspiirid.

BMM-d on tuntud kui laia substraadispetsiifilisusega ensüümid. Sama kehtib ka PH-de puhul, mis lubas oletada nende osalemist tolueeni degradeerimisel. Selleks, et kindlaks teha, kas käesolevas töös uuritud *Acinetobacter*’id kasutavad tolueeni lagundamiseks PH-sid, valiti

välja 2 *Acinetobacter*'i tüve (2D67 ja D14). Nagu on näha jooniselt 5B, oli mõlemal tüvel identne LmPH piirkond, tänu millele sai kasutada qRT-PCR analüüsiks samu LmPH praimereid (Tabel 1). Tulemused näitasid, et tolueen ei indutseerinud LmPH geeni kummaski tüves, küll aga oli ekspressioonitase 18,41 korda kõrgem tüve D14 puhul fenooli kui induktori juuresolekul ($p < 0,005$) võrreldes indktrivaba söötmega. Kuna nii D14 kui 2D67 puhul olid olemas täisgenoomi järjestused, selgus, et tüve 2D67 PH operon oli mittetäielik, mis selgitas küll LmPH ekspressiooni puudumist, kuid selgusetuks jäi see, millise ensüümi abil lagundas see tüvi fenooli. Samuti ei saanud siduda *Acinetobacter*'ite kasvu tolueenil PH aktiivsusega.

KATSETULEMUSTE ARUTELU

Selleks, et saada teavet tolueeni kui potentsiaalse naftareostuse ühe peamise komponendi võimalike lagundamisradade kohta Läänemere bakteritel, analüüsisiti käesolevas töös kultiveerimisele alluvaid efektiivseid aromaatsete ühendite biodegradeerijaid tüvesid, kes olid isoleeritud Läänemere veeproovidest ja deponeeritud CELMS-i. Uurimiseks väljavalitud 44 tolueeni lagundavast bakterist moodustasid rõhuva enamuse pseudomonaadid, kelle hulgas domineerisid omakorda *P. stutzeri* erinevad tüved. Seoses sellega, et suur osa tüvedest osutus ka fenoolilagundajateks, oldi neid mitmesuguste tunnuste osas juba varem meie töörühma poolt iseloomustatud (Vedler *et al.*, 2013). Samuti oli juba eelnevalt tuvastatud plasmiidse DNA olemasolu antud töös uuritud 16 tolueenilagundajas (Jutkina *et al.*, 2011). Varasemate tööde andmete kasutamine oli vajalik mõistmaks erinevate tolueeni lagundamiradade toimimist.

Põhjusel, et uuritud tüved pärinevad Läänemerest kui siseveekogude poolt tugevalt mõjutatud keskkonnast, võiks eeldada ka sarnaste bakteritüvede esinemist selles fenooli/tolueenilagundajate konsortsiumis. Kui aromaatsete ühendite suure reostuskoormusega piirkondade jõgede veest on meie töörühma poolt varasemalt isoleeritud liikide *P. fluorescens*, *P. mendocina* ja *P. putida* tüvesid (Heinaru *et al.*, 2000), siis merevees prevaleerusid just *P. stutzeri* erinevad esindajad. On näidatud, et viimased on enam tundlikud fenoolse reostuse suhtes võrreldes *P. fluorescens*'i ja *P. putida* tüvedega (Whiteley *et al.*, 2001). Seega suur *P. stutzeri* tüvede esindatus merevees võib viidata väiksemale fenoolsele reostusele selles keskkonnas. Lisaks mitmesuguste ksenobiootiliste ühendite degradeerimise võimele on *P. stutzeri*l täita veel ka teine oluline ökoloogiline funktsioon, so. denitrifikatsioon, mis tähendab, et nad võivad käituda ka fakultatiivsete anaeroobidena. Hapnikuvaeses Läänemere vees hakkama saamiseks on see aga oluline eelis.

Teiseks suuremaks tolueenikasutajate rühmaks osutusid perekonda *Acinetobacter* kuuluvad tüved. Selle perekonna esindajad on üldiselt tuntud kui mitmesuguste loodus- ja inimtekkeliste aromaatsete ühendite lagundajad ning on keskkonnas laialt levinud (Jung *et al.*, 2011). Väga erinevate substraatide kasutamise võime lubab oletada neil ka seni tundmata kataboolsete radade ja geenide olemasolu. Selle kohta annavad kasulikku informatsiooni täisgenoomide võrdlevad uuringud.

Käesolevas töös uuriti lähemalt kolme perekonda *Acinetobacter* kuuluva tüve (2D67, D65v ja D14) kataboolseid geene, saamaks informatsiooni just tolueeni kasutamise radade kohta. Kahjuks ei leitud nendest tüvedest aga ei PCR anaüüsi ega täisgenoomide sekveneerimise abil ühtki tolueeni lagundamises potentsiaalselt osalevat geeni. Kuna uuritavad tüved osutusid fenoolilagundajateks ning mPH kandjateks, siis oletati selle kui TMO-dega sarnase ensüümi (Cafaro *et al.*, 2004) osalust tolueeni lagundamises. qRT-PCR-i tulemused ei kinnitanud tehtud oletust kahe uuritava tüve (2D67 ja D14) puhul. Tuleb siiski öelda, et kõik antud perekonna esindajad on suhteliselt erinevate biokeemiliste omadustega, kuid sarnanevad aromaatsse tuuma lagundamise poolest - neil puudub *meta*-rada. Võimalus aromaatsse tuuma lagundamiseks on sel juhul üle C12O, P34O või G12O. Tüve D65v puhul täheldati gentisaadi (2,5-dihüdroksübensoaat) degradeerimisvõimet, kuid ühtegi G12O-d kodeerivat geeni ei õnnestunud tema genoomis tuvastada. Samal ajal kasvas see tüvi hästi just *m*-kresoolil kui tüüpilisel gentisaadi raja substraadil (Romero-Silva *et al.*, 2013). Ainuke seni teadaolev gentisaati lagundav bakter *Acinetobacter oleivorans* DR1 on isoleeritud riisipõllu mullast (Kang *et al.*, 2011). Seda ning *A. baylyi* ADP1, *A. calcoaceticus* PHEA-2 ja *A. baumannii* ATTC 17978 tüvesid kasutati Parki ja Madseni tööühma poolt atsinetobakteritele võrdleva genoomse analüüsi tegemiseks (Jung *et al.*, 2011). Selgus, et unikaalseks tunnuseks tüvele DR1 oli just G12O (*nagI*).

Kuna protokatehhuaadi (3,4-dihüdroksübensoaat) lagundamisrada on keskkonnast isoleeritud bakterite seas laialt levinud (Romero-Silva *et al.*, 2013), näitasid ka antud töös uuritud atsinetobakterite kasvuspektrid *p*-hüdroksübensoaadil ja protokatehhuaadil β -ketoadipaatsse raja olemasolu. Tolueeni kasutamiseks peavad selle grupi bakterid metüülühma oksüdeerima, peale mida on võimalik *ortho*-raja toimimine, seda kas üle katehhooli või protokatehhuaadi. *Acinetobacter* sp. tüves B113 on näidatud, et tolueeni lagundamises osaleb tolueeni dioksügenaasi geeniga (TODC1) sarnane oksügenaasi geen (Kim ja Jeon, 2009). Lahtiseks jääb katabolismi käigus aromaatsse rõnga avamisel osalev ensüüm. Segadust metüleeritud aromaatssete ühendite lagundamisel atsinetobakterite poolt lisab veel tüüpilise Xyl-raja võtmeensüümi BADH tuvastamine (Chalmers *et al.*, 1991). Antud töös uuritutest kasvas bensüülalkoholil hästi vaid tüvi D14. Selline võimalusterohkus atsinetobakteritel lubab oletada metüleeritud ühendite lagundamiseks klassikalistest katabolismiradadest erinevat - modifitseeritud/hübriidse raja või radade esinemist, mille tõestuseks on kindlasti tarvis teha täisgenoomne analüüs.

TMO ja PH on laia substraadispetsiifilisusega multikomponentsed monooksügenaasid, mis oksüdeerivad erinevate asendustega benseene katehoolideks (Cafaro *et al.*, 2005). Need BMM-id on pälvinud erilist huvi just tänu soodustavale toimele mitmesugustes kataboolsetes ja detoksifikatsiooni reaktsioonides, laiendades tunduvalt mikroobi poolt kasutatavate substraatide ringi ja vältides toksiliste vaheproduktide kogunemist. Erinevate BMM-ide koosfunktioneerimine mitmesuguste mittehüdrosüleeritud aromaatsete süsivesinike lagundamisel annab tüvele metaboolse paindlikkuse ja seega eelise muutuvates keskkonnatingimustes hakkama saamiseks (Notomista *et al.*, 2011). Siiski tuleb arvestada ka nendel monooksügenaasidel teatud erinevusi substraatide kasutamisel ja eriti regioonispetsiifilisust. Nii on kirjanduse andmetel Tom ja Tou monooksügenaasid laia substraadi- ning nõrga regioonispetsiifilisusega vastupidiselt Tbu ning Tmo monooksügenaasidele (Bertoni *et al.*, 1998; Leahy *et al.*, 2003). Antud uurimistöös saadud andmetest (Tabel 2..) nähtus samuti minimaalset TMO-de rühmitumist substraatide kasutamise järgi. Kui II klastrisse kuuluvad TMO-d olid laiema substraadispetsiifikaga, siis I ja III klatri TMO-d olid kitsama substraatsse spektriga ja enam regioonispetsiifilised. Oletuslikult võivad TMO-de II klastrisse olla grupeerunud Tom-tüüpi monooksügenaasid. Kuigi III klatri tüvede TMO-d on identsed *P. stutzeri* OX1 tüübiga (Tou), pole nad nõrga regioonispetsiifikaga, vaid kasutavad eelistatult *p*-kresooli. Seda vastuolu on võimalik kirjanduse andmetega põhjendada ühelt poolt III klatriks olevate tüvede omapäraga. Nimelt on neil rakus aktiivsed kaks sama funktsiooniga valku - nii Tou-tüüpi benseeni rõngast hüdrosüleeriv monooksügenaas ja metüülrühma oksüdeeriv Xyl-raja ksüleeni/tolueeni monooksügenaas. Teisalt võib selline mõlema ensüümi funktsionaalsuse tuvastamine olla ka uueks tolueeni lagundamise raja võimaluseks.

Redundantsete kataboolsete geenide esinemist bakterirakkudes on täheldatud mitmete autorite poolt (Lanfrancori *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2014). Näiteks *P. stutzeri* tüvi AN10 kodeerib kaht salitsülaadi hüdrosülaasi (NahG ja NahW), mis on oma aminohappelises järjestuses vaid 22% ulatuses identsed ning mõlemad ensüümid on samas rakus funktsionaalsed. Lanfranconi kaastöötajatega (2009) näitas, et *nahW* rikkumise korral on selle mutandi kasv naftaleenil lausa 50% aeglasem kui metsiktüvel. Mutant ei olnud võimeline naftaleenist moodustunud salitsülaati katehoolini viima, mis kinnitab mõlema geeni samaaegse funktsioneerimise tähtsust. Arvatakse, et kahe sama funktsiooniga geeni esinemine võib anda bakterile muutuvates keskkonnatingimustes toime tulemiseks eelise, kuna toodetakse piisavalt palju aktiivset ensüümi, et suunata aromaatsete ühendite lagundamisel tekkivad toksilised vaheproduktid TCA-sse. *P. putida* tüvi mt-2 lagundab katehooli *meta*-rada mööda TOL

plasmidi *xyl* toimel ja kromosomaalselt *ben* ja *cat* osalusel (Assinder ja Williams, 1990). Nimetatud tüvi omab teist kromosomaalset *catA* koopiat (*catA2*), mis kodeerib veel ühte C12O-d. Selgus, et kui plasmidi vabal tüvel oli *ortho*-rada bensoadi poolt üles indutseeritud, tekkis katehhooli ülejääk, mille toksilisuse elimineerimiseks indutseeriti CatA2 kui metaboolne kaitseventiil (Jiménez *et al.*, 2014).

Tolueeni (ja muude saasteainete) biodegradatsiooni funktsionaalne redundantus väljendub kaht või enam erineva järjestusega, ent sama funktsiooni täitva kataboolse geeni(klastri) esinemises sama raku genoomis, viidates sellele, et need kataboolsed geenid võivad olla saadud horisontaalsel geeniülekanal, võimaldamaks bakteritele evolutsioonilist plastilisust muutuvates multisubstraatsetes keskkonnatingimustes. Redundantsete funktsioonidega bakterite genoomide ja nende kataboolsete geenide edasine võrdlev analüüs võimaldab täpsustada ja täiendada käesoleva töö tulemusi.

KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Käesolevas töös tuvastati Läänemere veest isoleeritud bakterite kollektsioonist 44 tolueenilagundajat tüve ning iseloomustati neid fenotüübiliste ja geneetiliste tunnuste põhjal. Enamus tolueenilagundajatest bakteritest osutus ka fenoolidegradeerijateks, kusjuures mõlema substraadi katabolismi võtmeensüümidenä toimisid laia substraadispetsiifilisusega multikomponentsed monooksügenaasid. Uuritud tüvedel tuvastati nende tolueeni katabolismi ensüüme kodeerivaid geenid ja teostati võrdlev fülogeneetiline analüüs. Lähemalt määrati redundantseid kataboolseid radu omavates tüvedes võtmeensüümide aktiivsus ja redundantsete geenide mRNA ekspressiooni tase.

Tulemuste põhjal tehti järgmised järeldused:

1. Valdav enamus tolueenilagundajatest olid *Pseudomonas stutzeri* tüved ja vähemal määral perekonna *Acinetobacter* esindajad. Aromaatsete substraatide kasutamise järgi jaotusid uuritud tüved erinevatesse gruppidesse.
2. Uuritud fenooli/tolueenilagundajate hulgast leiti nii benseenituuma hüdroksüleerivaid (TMO-tüüpi) kui ka metüülrühma oksüdeerivaid (Xyl-tüüpi) tolueeni monooksügenaase, kuid tolueeni dioksügenaaside esinemist selles kollektsioonis ei sedastatud.
3. Fülogeneetilisel analüüsil selgitati, et tolueeni monooksügenaasid on evolutsioneerunud koos fenooli hüdroksülaasidega ja enamus neist klasterdus kaugemale tuntud järjestustest.
4. Kõigis tolueeni monooksügenaasi omavates tüvedes toimus aromaatses tuuma lagundamine üle katehhooli 2,3-dioksügenaasi e. *meta*-raja ning alternatiivne *ortho*-rada üle protokatehhuaadi neil puudus.
5. Redundantsete katalüütiliste funktsioonidega tüvedel olid erinevate geenide poolt kodeeritud tolueeni lagundamisrajad samaaegselt funktsionaalsed.
6. Perekond *Acinetobacter* tüved eristusid teistest tolueenilagundajatest selle poolest, et neil esines küll β -ketoadipaatne e. *ortho*-rada, kuid metüülrühma oksüdeeriva ensüümi olemasolu ei õnnestunud tuvastada, st. selgitada neil üheselt tolueeni lagundamisvõimet määravat katabolismirada.

Diversity of Multicomponent Monooxygenases in Toluene-degrading Bacteria from the Baltic Sea water

SUMMARY

In recent work 44 toluene-degrading strains were isolated from the Baltic Sea water and characterized by their phenotypic and genetic features. Most of them were also able to degrade phenol. For the catabolism of both substrates bacterial multicomponent monooxygenases with wide substrate-specificity were needed. In this study, genes active in toluene catabolism were identified and their phylogenetic analyses were performed. Activity of the key enzymes and the amount of mRNA expression were specified in bacteria with redundant catabolic degradation pathways.

Based on the results obtained in the current study, the following conclusions were made:

1. Most of the toluene-degraders belonged to the species *Pseudomonas stutzeri*. A smaller group consisted of the *Acinetobacteria* strains. They distributed into different groups by their aromatic substrate specificity.
2. Bacterial monooxygenases hydroxylating the aromatic ring (TMO-type) or the methyl-group (Xyl-type) of benzene were detected in the studied strains. We were not able to detect any of the genes coding for toluene dioxygenase.
3. Phylogenetic analyses showed that toluene monooxygenases and phenol hydroxygenases have probably evolved together. Most of them clustered far away from known sequences.
4. Bacterial strains possessing toluene monooxygenase used catechol 2,3-dioxygenase (*meta*-pathway) for aromatic ring degradation. Alternative pathway (*ortho*) over the protocatechuate was not detected.
5. Toluene degradation pathways encoded by different genes functioned at the same time in strains with redundant catalytic functions.
6. *Acinetobacteria* strains catabolized toluene through β -ketoadipate (*ortho*) pathway, but differed from other toluene-degraders by their lack of methyl-group oxydizing enzyme, which means that we were not able to confirm which pathway was used for toluene degradation in these strains.

TÄNUAVALDUSED

Eeskätt tänan oma juhendajat Eeva Heinaru, kelle suur abi ja kasulikud õpetussõnad muutsid käesoleva uurimistöö kirjutamise äärmiselt toredaks ja õpetlikuks kogemuseks. Tänan ka oma teist juhendajat Eve Vedlerit abi ja toetuse eest.

KIRJANDUSE LOETELU

Arengi, F. L., Berlanda, D., Galli, E., Sello, G. and Barbieri, P. (2001). Organization and regulation of *meta*-cleavage pathway gene for toluene and *o*-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3304–3308.

Assinder, S. J. and Williams, P. A. (1990). The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* 31, 1-69.

Bailey, L. J., McCoy, J. G., Phillips Jr., G. N. and Fox, B. G.. (2008). Structural consequences of effector protein complex formation in a diiron hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19194–19198.

Barbieri, P., Galassi, G., and Galli, E. (1989). Plasmid-encoded mercury resistance in a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *FEMS Microbiol. Lett.* 62, 375–383.

Bate-Smith, E. C. (1962). The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. I. Dicotyledons. *J. Linn. Soc. Lond.* 371, 95–173.

Bertoni, G., Bolognesi, F., Galli, E. and Barbieri, P. (1996). Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3704–3711.

Bertoni, G., Martino, M., Galli, E. and Barbieri, P. (1998). Analysis of the gene cluster encoding toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3626–3632.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Brettar, I., Christen, R. and Höfle, M.G. (2012). Analysis of bacterial core communities in the central Baltic by comparative RNA-DNA-based fingerprinting provides links to structure-function relationships. *ISME J.* 6, 195-212.

Bruce, R. M., Santodonato, J. and Neal, M. W. (1987). Summary review of the health effects associated with phenol. *Toxicol. Ind. Health.* 3 (4), 535-568.

Bugg, T. (1997). An introduction to enzyme and coenzyme chemistry, 1st edition. Blackwell Science, Oxford.

Burton, S. G. (2003). Oxidising enzymes as biocatalysts. *Trends. Biotechnol.* 21, 543–549.

Byrne, A. M., Kukor, J. J. and Olsen, R. H. (1995). Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Gene.* 154 (1), 65-70.

Cafaro, V., Izzo, V., Scognamiglio, R., Notomista, E., Capasso, P., Casbarra, A., Pucci, P. and Donato, A.D. (2004). Phenol hydroxylase and toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2211–2219.

Cafaro, V., Notomista, E., Capasso, P. and Di Donato, A. (2005). Regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: molecular basis for catabolic adaptation of this microorganism to methylated aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (8), 4736-4743.

Cafaro, V., Scognamiglio, R., Viggiani, A., Izzo, V., Passaro, I., Notomista, E., Piaz, F. D., Amoresano, A., Casbarra, A., Pucci, P. and Di Donato, A. (2002). Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/*o*-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex. *Eur. J. Biochem.* 269, 5689–5699.

Cao, B., Nagarajan, K. and Loh, K. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 207-228.

Chalmers, R. M., Keen, J. N. and Fewson, C. A. (1991). Comparison of benzyl alcohol dehydrogenases and benzaldehyde dehydrogenases from the benzyl alcohol and mandelate pathways in *Acinetobacter calcoaceticus* and from the TOL-plasmid-encoded toluene

pathway in *Pseudomonas putida*. N-terminal amino acid sequences, amino acid compositions and immunological crossreactions. *Biochem. J.* 273 (1), 99-107.

Claus, H. and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinase. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 3–14.

Cline, P. V., Delfino, J. J. and Rao, P. S. C. (1991). Partitioning of aromatic constituents into water from gasoline and other complex solvent mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 25, 914–920.

Connors, M. A. and Barnsley, E. A. (1982). Naphthalene plasmids in pseudomonads. *J. Bacteriol.* 149 (3), 1096-1101.

Dagley, S. and Gibson, D.T. (1965). The bacterial degradation of catechol. *Biochem. J.* 95, 466-474.

Dinkla, I. J., Gabor, E. M. and Janssen, D. B. (2001). Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the tol (pWWO) plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (8), 3406-3412.

Enroth, C., Neujahr, H., Schneider, G. and Lindqvist, Y. (1998). The crystal structure of phenol hydroxylase in complex with FAD and phenol provides evidence for a concerted conformational change in the enzyme and its cofactor during catalysis. *Structure.* 6, 605–617.

Feingersch, R., Shainsky, J., Wood, T. K. and Fishman, A. (2008). Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of chiral sulfoxides. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1555–1566.

Feist, C. F. and Hegeman, G. D. (1969). Regulation of the meta cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 100 (2), 1121-1123.

Fishman, A., Tao, Y. and Wood, T. K. (2004). Physiological relevance of successive hydroxylations of toluene by toluene *para*-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. *Biocat. Biotrans.* 22, 283–289.

Futamata, H., Harayama, S. and Watanabe, K. (2001). Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4671–4677.

Gibson, D. T., Hensley, M., Yoshioka, H. and Mabry, T. J. (1970). Formation of (p)-cis-2, 3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*. *Biochem.* 9, 1626–1630.

Gunkel, W. and Gassmann, G. (1980). Oil, oil dispersants and related substances in the marine environment. *Helgoländ. Meeresunt.* 33, 164–181.

Haigler, B. E. and Spain, J. C. (1991). Biotransformation of nitrobenzene by bacteria containing toluene degradative pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3156–3162.

Haigler, B. E., Pettigrew, C. A. and Spain, J. C. (1992). Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2237–2244.

Harayama, S. and Renik, M. (1989). Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.* 264, 15328-15333.

Harwood, C. S. and Parales, R. E. (1996). The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 533–590.

Head, I. M., Jones, D.M. and Röling, W. F. M. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature.* 4, 173-182.

Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 195-205.

Heinaru, E., Vedler, E., Jutkina, J., Aava, M. and Heinaru, A. (2009). Conjugal transfer and mobilization capacity of the completely sequenced naphthalene plasmid pNAH20 from multiplasmid strain *Pseudomonas fluorescens* PC20. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70 (3), 563-574.

Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L. and Hahnke, K. (1995). Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. *Mol. Genet. Genomics*. 247, 240–246.

Holmes, A.J. and Coleman, N.V. (2008). Evolutionary ecology and multidisciplinary approaches to prospecting for monooxygenases as biocatalysts. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94 (1), 75-84.

Jiménez, J. I, Pérez-Pantoja, D., Chavarria, M., Díaz, E. and De Lorenzo, V. (2014). A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.12361.

Johnson, G. R. and Olsen, R. H. (1997). Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (10), 4047-4052.

Johnson, G. R. and Olsen, R. H. (1995). Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene 2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (9), 3336–3346.

Jung, J., Madsen, E. L., Jeon, C. J. and Park, W. (2011). Comparative genomic analysis of *Acinetobacter oleivorans* DR1 to determine strain-specific genomic regions and gentisate biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (20), 7418–7424.

Jutkina, J., Hansen, L. H., Li, L., Heinaru, E., Vedler, E., Jõesaar, M. and Heinaru, A. (2013). Complete nucleotide sequence of the self-transmissible TOL plasmid pD2RT provides new insight into arrangement of toluene catabolic plasmids. *Plasmid*. 70 (3), 393-405.

Jutkina, J., Heinaru, E., Vedler, E., Juhanson, J. and Heinaru, A. (2011). Occurrence of plasmids in the aromatic degrading bacterioplankton of the Baltic Sea. *Genes*. 2 (4), 853-868.

Kahng, H.-Y., Malinverni, J. C., Majko, M. M. and Kukor, J. J. (2001). Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4805–4816.

- Kang, Y. S., Jung, J., Jeon, C. O. and Park, W.** (2011). *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. *J. Microbiol.* 49, 29–34.
- Kim, J. M. and Jeon, C. O.** (2009). Isolation and characterization of a new benzene, toluene and ethylbenzene degrading bacterium *Acinetobacter* sp. B113. *Curr. Microbiol.* 58 (1), 70–75.
- Klecka, G. M. and Gibson, D. T.** (1981). Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1159–1165.
- Knackmuss, H. J. and Hellwig, M.** (1978). Utilization and cooxidation of chlorinated phenols by *Pseudomonas* sp. B13. *Arch. Microbiol.* 117 (1), 1–7.
- Koppmann, R., Khedim, A., Rudolph, J., Poppe, D., Andreae, M. O., Helas, G., Welling, M. and Zenker, T.** (1997). Emissions of organic trace gases from savanna fires in southern Africa during the 1992 Southern African Fire Atmosphere Research Initiative and their impact on the formation of tropospheric ozone. *J. Geophys. Res.* 102, 18879–18888.
- Koskinen, K., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen P. and Kankaanpää, H.** (2011). Spatially differing bacterial communities in water columns of the northern Baltic Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 99–110.
- Kovárová-Kovar, K. and Egli, T.** (1998). Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 3, 646–666.
- Lanfranconi, M. P., Christie-Oleza, J. A., Martín-Cardona, C., Suárez-Suárez, L. Y., Lalucat, J., Nogales, B. and Bosch, R.** (2009). Physiological role of NahW, the additional salicylate hydroxylase found in *Pseudomonas stutzeri* AN10. *FEMS Microbiol. Lett.* 300 (2), 265–272.
- Li, Z., Van-Beilen, J.B., Duetz, W.A., Schmid, A., Raadt, A.D., Griengl, H. and Witholt, B.** (2002). Oxidative biotransformations using oxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 136–144.

Lazaridis, T. and Karplus, M. (1999). Effective energy function for proteins in solution. *Proteins*. 35, 133–152.

Leahy, J. G., Batchelor, P. J. and Morcomb, S. M. (2003). Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 449–479.

McGuirl, M. A. and Dooley, D. M. (1999) Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 138–144.

Mukherjee, P. and Roy, P. (2013). Copper enhanced monooxygenase activity and FT-IR spectroscopic characterisation of biotransformation products in trichloroethylene degrading bacterium: *Stenotrophomonas maltophilia* PM102. *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2013/723680.

Murreil, J. C., Gilbert, B. and McDonald, I. R. (2000). Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch. Microbiol.* 173 (5-6), 325–332.

Newman, L. M. and Wackett, L. P. (1995). Purification and characterization of toluene 2-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* G4. *Biochem.* 34, 14066–14076.

Newman, L. M. and Wackett, L. P. (1997). Trichloroethylene oxidation by purified toluene 2-monooxygenase: products, kinetics, and turnover-dependent inactivation. *J. Bacteriol.* 179 (1), 90-96.

Nolan, L., C. and O'Connor, K., E. (2008). Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnol. Lett.* 1879–1891.

Nordlund, I., Powlowski, I. and Shingler, V. (1990). Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 172, 6826–6833.

Notomista, E., Lahm, A., Di Donato, A. and Tramontano, A. (2003). Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *J. Mol. Evol.* 56, 435–445.

- Ornston, L. N. and Stanier, R. Y.** (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241 (16), 3776-3786.
- Parales, R. E., Bruce, N. C., Schmid, A. and Wackett, L. P.** (2002). Biodegradation, biotransformation and biocatalysis (b3). *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4699–4709.
- Parales, R. E., Parales, J. V., Pelletier, D. A. and Ditty, J. L.** (2008). Diversity of microbial toluene degradation pathways. *Adv. Appl. Microbiol.* 64, 1-73.
- Park, J., Kim, D., Kim, S., Kim, J., Bae, K. and Lee, C.** (2007). The analysis and application of a recombinant monooxygenase library as a biocatalyst for the Baeyer-Villiger reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 1083–1089.
- Peters, M., Heinaru, E., Talpsep, E., Wand, H., Stottmeister, U., Heinaru, A. and Nurk, A.** (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different in digenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4899–4906.
- Pikus, J. D., Studts, J. M., Achim, C., Kauffmann, K. E., Münck, E., Steffan, R. J., McClay, K. and Fox, B. G.** (1996). Recombinant toluene 4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex. *Biochem.* 35, 9106–9119.
- Powlowski, J. and Shingler, V.** (1994). Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF 600. *Biodegr.* 5, 219–236.
- Rheinheimer, G.** (1998). Pollution in the Baltic Sea. *Naturwissenschaften.* 85 (7), 318-329.
- Romero-Silva, M. J., Méndez, V., Agulló, L. and Seeger, M.** (2013). Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0056038.
- Seo, S-Y, Sharma, V. and Sharma, N.** (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.

Shingler, V., Powlowski, J. and Marklund, U. (1992). Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* 174 (3), 711-724.

Sinninghe Damste, J. S., De las Heras, F. X. C. and De Leeuw, J. W. (1992). Molecular analysis of sulphur-rich brown coals by flash pyrolysis gas-chromatography mass-spectrometry: The type III-S kerogen. *J. Chromatogr.* 607, 361–376.

Studts, J. M. and Fox, B. G. (1999). Application of fed-batch fermentation to the preparation of isotopically labeled or selenomethionyl-labeled proteins. *Protein Expr. Purif.* 16 (1), 109-119.

Tamman, H., Ainelo, A., Ainsaar, K. and Hõrak, R. A. (2014). Moderate toxin, GraT, modulates growth rate and stress tolerance of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 196 (1), 157-169.

Tiirik, K., Nõlvak, H., Oopkaup, K., Truu, M., Preem, J. K., Heinaru, A. and Truu, J. (2014). Characterization of the bacterioplankton community and its antibiotic resistance genes in the Baltic Sea. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61 (1), 23-32.

Tinberg, C. E., Song, W. J., Izzo, V. and Lippard, S. J. (2011). Multiple roles of component proteins in bacterial multicomponent monooxygenases: phenol hydroxylase and toluene/o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas* sp. OX1. *Biochem.* 50 (11), 1788-1798.

Ullrich, R. and Hofrichter, M. (2007). Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 271–293.

Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S. and Schmid, R. D. (2004). Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64 (3), 317–325.

Van der Meer, J. R., De Vos, W. M., Harayama, S. and Zehnder, A. J. B. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677-694.

- Van der Meer, J. R.** (1997). Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, 159-178.
- Van der Werf, M. J.** (2000). Purification and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 involved in three different monocyclic monoterpene degradation pathways. *Biochem. J.* 347 (3), 693–701.
- Qian, H., Edlund, U., Powlowski, J., Shingler, V. and Sethson, I.** (1997). Solution structure of phenol hydroxylase protein component P2 determined by NMR spectroscopy. *Biochem.* 36, 495–504.
- Olsen, R. H., Kukor, J. J. and Kaphammer, B.** (1994). A novel toluene 3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* 176, 3749–3756.
- Zylstra, G. J. and Gibson, D. T.** (1989). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2*-BADE genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 14940–14946.
- Zylstra, G. J., McCombie, W. R., Gibson, D. T. and Finette, B. A.** (1988). Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: Genetic organization of the *tod* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1498–1503.
- Schmidt, E., Bartels, I. and Knackmuss, H.-J.** (1985). Degradation of 3-chlorobenzoate by benzoate or 3-methylbenzoate-utilizing cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 381-389.
- Shaw, J. P. and Harayama, S.** (1992). Purification and characterisation of the NADH: Acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* mt-2. *Eur. J. Biochem.* 209, 51–61.
- Shields, M. S. and Francesconi, S. C.** (1996). Microbial degradation of trichloroethylene dichloroethylenes and aromatic pollutants. US Patent, 5543317.
- Shields, M. S., Reagin, M. J., Gerger, R. R., Campbell, R. and Somerville, C.** (1995). TOM, a new aromatic degradative plasmid from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1352–1356.

- Subramanian, V., Liu, T.-N., Yeh, W.-K. and Gibson, D. T.** (1979). Toluene dioxygenase: Purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 1131–1139.
- Suzuki, M., Hayakawa, T., Shaw, J. P., Rekik, M. and Harayama, S.** (1991). Primary structure of xylene monooxygenase: Similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* 173, 1690–1695.
- Torres Pazmino, D. E., Winkler, M., Glieder, A. and Fraaije, M. W.** (2010). Monooxygenases as biocatalysts: classification, mechanistic aspects and biotechnological applications. *J. Bacteriol.* 146, 9–24.
- Vedler, E., Heinaru, E., Jutkina, J., Viggor, S., Kõressaar, T., Remm, M. and Heinaru, A.** (2013). *Limnobacter* spp. as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea surface water bacteria characterised by comparative analysis of catabolic genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 36 (8), 525-532.
- Wackett, L. P. and Hershberger, C. D.** (2001). Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds, 1st edition. ASM Press, Washington, DC.
- Watanabe, K., Futamata, H. and S. Harayama.** (2002). Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Antonie van Leeuwenhoek.* 81, 655–663.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H. and Harayama, S.** (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4396–4402.
- Whited, G. M. and Gibson, D. T.** (1991). Toluene 4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* 173, 3010–3016.

Whiteley, A. S., Wiles, S., Lilley, A. K., Philp, J. and Bailey, M. J. (2001). Ecological and physiological analyses of *Pseudomonad* species within a phenol remediation system. *J. Microbiol. Methods*. 44 (1), 79-88.

Worsey, M. J. and Williams, P. A. (1975). Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* 124, 7–13.

Yen, K. M. and Karl, M. R. (1992). Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene 4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* 174 (22), 7253-7261.

Yen, K.-M., Karl, M. R., Blatt, L. M., Simon, M. J., Winter, R. B., Fausset, P. R., Lu, H. S., Harcourt, A. A. and Chen, K. K. (1991). Cloning and characterization of a *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene 4-monooxygenase. *J. Bacteriol.* 173, 5315–5327.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://pollution.unibuc.ro/?substance=47>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Maarja Grünbach**, (sünnikuupäev: 08.02.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Multikomponentsete monooksügenaaside mitmekesisus Läänemere

tolueenilagundajates bakterites, mille juhendajad on Eeva Heinaru ja Eve Vedler,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.14